

# Doença Hemorrágica do Coelho: papel dos macrófagos na patogénese da doença

Joana Correia Ribeiro

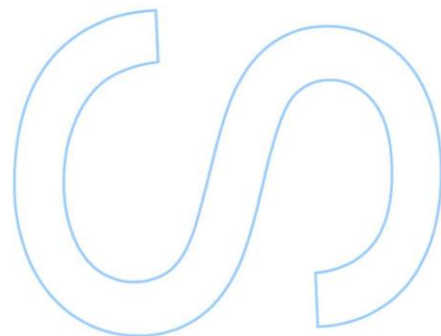
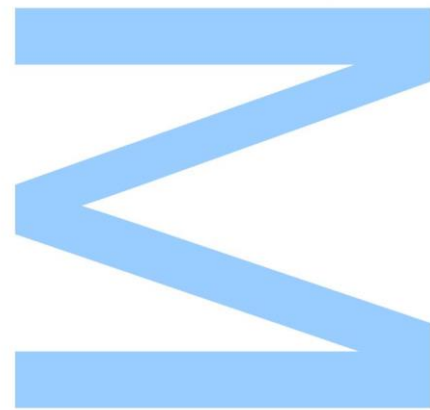
Mestrado em Bioquímica  
Departamento de Química e Bioquímica  
2015

## **Orientador**

Professora Doutora Paula Ferreira, Professora Associada, ICBAS-UP

## **Coorientadores**

Doutora Raquel Marques, Colaboradora Externa, ICBAS-UP  
Doutora Luzia Teixeira, Investigadora Auxiliar, ICBAS-UP



**U. PORTO**

 INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

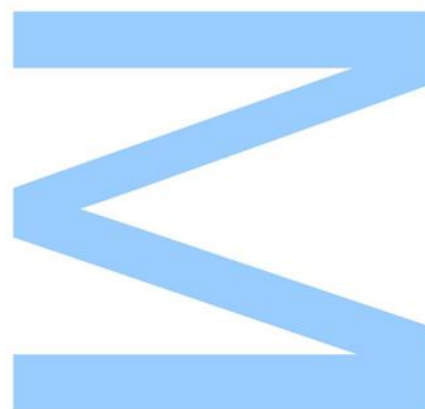
**U. PORTO**

 FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Todas as correções determinadas  
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_







## Agradecimentos

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Paula Ferreira pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Anatomia e desenvolver o trabalho iniciado na Licenciatura. Agradeço-lhe toda a simpatia, disponibilidade, dedicação, excelente orientação e por todas as correções científicas sugeridas.

À Doutora Raquel Marques pela simpatia, dedicação, disponibilidade, amizade e paciência. Agradeço-lhe especialmente por toda a confiança que depositou em mim, todos os conhecimentos valiosos que me transmitiu, todos os conselhos e dicas, todo o apoio científico, bem como todos os momentos de descontração passados no laboratório. A sua orientação foi fundamental para a minha aprendizagem e evolução ao longo deste ano.

À Doutora Luzia Teixeira pela simpatia, disponibilidade e ajuda científica.

À Dra. Madalena Costa e à Ana Pinto pela simpatia, boa disposição, ajuda e apoio técnico prestado sempre que necessário.

Ao Sr. Costa e à D. Manuela pela preciosa ajuda e apoio técnico prestado nos dias de experiência.

Aos restantes elementos do Departamento de Anatomia, pela simpatia, boa disposição sempre presente e pela partilha de conhecimentos.

Ao Laboratório de Imunogenética do ICBAS, pela disponibilidade demonstrada para a realização do doseamento e conversão de *RNA* e *RT-qPCR*.

À Cíntia, ao Diogo e à Jessica por me acompanharem ao longo destes 5 anos. Por todos as gargalhadas, por todos os bons momentos que partilhámos, pela amizade que nos une, por serem os melhores amigos que uma pessoa pode desejar.

À Sofia e ao Tiago pelos bons momentos de convívio e descontração.

À Filipa e à Gi, porque mesmo estando longe estão sempre por perto. Por nada mudar quando estamos novamente juntas.

À minha família, pelo apoio, carinho, amor e preocupação. Por serem a melhor família do mundo.

Ao meu irmão, pelo apoio, preocupação, por estar sempre disponível e com paciência para mim, pelas nossas brincadeiras.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, dedicação, carinho, apoio, paciência. Agradeço-lhes especialmente, pela excelente educação que me proporcionaram, pelos conselhos sábios, por estarem sempre presentes, por sempre terem acreditado em mim e por me fazerem sentir um motivo de orgulho. Sem eles não teria chegado até aqui.

Ao Helder, por tudo. Agradeço-lhe especialmente pela amizade, amor, cumplicidade, paciência, precioso apoio, por saber sempre o que dizer, por estar sempre sempre presente e por todos os momentos juntos.

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/CTV/122905/2010) e por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE (FCOMP-01-0124-FEDER-020159).

## Resumo

A Doença Hemorrágica do Coelho (DHC) é causada por um vírus da família *Caliciviridae*, sendo responsável pela morte de cerca de 90% dos coelhos adultos infectados (*Oryctolagus cuniculus*) entre as 24 e as 72 horas de infeção. Interessantemente, os coelhos jovens são naturalmente resistentes à infeção, sendo que os mecanismos desta resistência ainda não se encontram esclarecidos. Do mesmo modo pouco se sabe sobre a patogénese da DHC. Estudos publicados no âmbito de outras febres hemorrágicas virais mostram que os macrófagos terão um papel importante na fisiopatologia da infeção, nomeadamente poderão suprimir a resposta imune do hospedeiro contra o vírus, contribuindo para a sua disseminação sistémica, e produzir exacerbadamente mediadores inflamatórios responsáveis pela lesão tecidual, nomeadamente vascular.

Neste trabalho investigámos o papel dos macrófagos na fisiopatologia da DHC, mais exatamente indagando a capacidade do VDHC para infectar esta população celular e avaliando os mediadores inflamatórios produzidos em cultura celular, para os tempos 2, 6 e 26 horas, pelos macrófagos alveolares e do fígado isolados de coelhos infectados experimentalmente com VDHC. Os resultados revelaram a presença do VDHC nos macrófagos às 24 horas após a infeção experimental. Para o tempo 2 horas de cultura, os macrófagos do fígado isolados de coelhos adultos infectados com VDHC apresentaram uma expressão significativamente superior de *mRNA* tanto de citocinas proinflamatórias (*IL1 $\beta$* , *TNF*, *IL6*) como de quimiocinas (*CCL2* e *CCL3*), que se traduziu em níveis aumentados destes mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das mesmas culturas nos animais em fases terminais de DHC (*IL1*, *TNF $\alpha$* , *CCL2*). O aumento da expressão do *mRNA* de citocinas proinflamatórias e quimiocinas, para os tempos de cultura 6 e 26 horas, só se mostrou significativo às 6 horas e após estimulação com VDHC+LPS. Contrariamente, para os macrófagos alveolares, não se detetaram alterações significativas nos níveis de expressão de *mRNA* de citocinas e quimiocinas, salvo às 6 horas de cultura e após estimulação por VDHC. Nestas condições foram identificados níveis de expressão relativa de *mRNA* de *IL1 $\beta$*  e *CCL2* significativamente inferiores nos macrófagos isolados de coelhos infectados com VDHC quando comparado com os controlos.

Foi também objetivo deste trabalho, clarificar a relação funcional entre os macrófagos e os linfócitos T, nomeadamente CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no âmbito da DHC, tendo-se realizado, para isso, um ensaio de co-cultura. Os resultados obtidos foram

considerados inconclusivos no que respeita à capacidade de os macrófagos ativarem linfócitos T, *in vitro*, bem como à capacidade de os linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) produzirem citocinas que estimulam a atividade microbicida dos macrófagos.

Em conclusão, demonstrámos que os macrófagos do fígado isolados de coelhos adultos infetados contribuem para a produção de citocinas proinflamatórias e quimiocinas que se sabe estarem exacerbadamente aumentadas na fase terminal da DHC – *cytokine storm* – contribuindo para o quadro lesional que caracteriza a doença, nomeadamente a lesão vascular. Reforça-se assim o interesse de se continuar a investigar o papel do macrófago na fisiopatologia da DHC, onde pode assumir um papel central, à semelhança de outras febres hemorrágicas virais.

**Palavras-chave:** Doença Hemorrágica do Coelho, Vírus da Doença Hemorrágica do Coelho, fígado, lavados broncoalveolares, macrófagos, linfócitos T, citocinas, quimiocinas, inflamação

## Abstract

The Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) is caused by a virus of the *Caliciviridae* family and kills 90% of infected adult rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) between 24-72 hours after infection. Interestingly, young rabbits are naturally resistant to infection. However those mechanisms of resistance are yet to be enlightened. That is also the case for the pathogenesis of RHD. Studies published on the field of other haemorrhagic viral fevers show that macrophages have an important role in the pathophysiology of infection, i.e., they produce a lot of inflammatory mediators responsible for vascular tissue damage and they can also suppress the hosts' immune response against the virus that contribute to its systemic dissemination.

In this work we have investigated the macrophages role in the pathophysiology of RHD, more precisely the capacity of RHDV to infect this cellular population and the analysis of the inflammatory mediators produced by the alveolar and liver macrophages of control and RHDV-infected rabbits at 2, 6 and 26 hours of culture. The results revealed the presence of the RHDV in the macrophages, 24 hours after infection. After 2 hours in culture, the isolated liver macrophages of the RHDV-infected adult rabbits presented a significant increase of *mRNA*, both of proinflammatory cytokines (*IL1 $\beta$* , *TNF*, *IL6*) and chemokines (*CCL2* and *CCL3*) that translated in raised levels of some of these inflammatory mediators on the culture supernatants from animals at a late stage of RHD (*IL1*, *TNF $\alpha$* , *CCL2*). Increased levels of proinflammatory cytokines and chemokines *mRNA* were only detected in liver macrophages at 6 hours of culture and after RHDV+LPS stimulation. On the contrary, for the alveolar macrophages, it was not detected any significant changes in the expression levels of *mRNA* of cytokines and chemokines, except at 6 hours of culture and after RHDV stimulation. In these conditions, it was observed a significant decrease of the levels of *mRNA* of *IL1 $\beta$*  e *CCL2* in the isolated macrophages of RHDV-infected rabbits, when compared to controls.

Another purpose of this work was to clarify the functional relation between macrophages and T cells, namely CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>. The results obtained were considered inconclusive, regarding the macrophages ability to activate T cells, *in vitro*, as well as the T cells (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) ability to produce cytokines, which stimulate the macrophages cytotoxic activity.

In conclusion, we have demonstrated that the isolated liver macrophages of infected adult rabbits contribute to the production of proinflammatory cytokines and chemokines, which is known to be increased at a late stage of the RHD – cytokine storm

– contributing to all the damage that is characteristic of the illness, namely vascular damage. Hence, these data reinforced the interest of continuing to investigate the role of macrophages in the pathophysiology of RHD, where they could have a central role, similar to what occur in other viral haemorrhagic fevers.

**Keywords:** Rabbit Haemorrhagic Disease, Rabbit Haemorrhagic Disease Virus, liver, bronchoalveolar lavage fluid, macrophages, T cells, cytokines, chemokines, inflammation



# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
<i>Abstract</i> .....	vii
Índice .....	ix
Lista de Figuras .....	xii
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Abreviaturas .....	xiv
Introdução.....	1
I. Doença Hemorrágica do Coelho .....	1
a) Distribuição geográfica e Relevância .....	1
b) Agente Etiológico da DHC .....	2
c) Estirpes patogénicas e não-patogénicas do VDHC.....	4
1. Estirpes patogénicas .....	4
2. Estirpes não-patogénicas .....	4
d) Infecção e Transmissão do VDHC.....	5
e) Sinais Clínicos e Quadro Patológico .....	6
f) Prevenção, Controlo e Vacinação da DHC .....	9
g) Mecanismos de Resistência da DHC .....	9
h) Os macrófagos na fisiopatologia da DHC .....	12
II. Macrófagos .....	13
a) Origem e localização dos macrófagos .....	14
b) Estados de ativação dos macrófagos .....	15
c) Funções dos macrófagos.....	17
d) Macrófagos residentes.....	19
1. Macrófagos alveolares .....	19
2. Células de <i>Kupffer</i> .....	20
Objetivos.....	21
Materiais e Métodos.....	22
I. Coelhos.....	22
II. Infecção com o VDHC.....	22
III. Ensaio <i>in vitro</i> – Cultura primária de macrófagos.....	23
a) Colheita de amostras biológicas .....	23

b)	Isolamento de macrófagos alveolares.....	24
c)	Isolamento de macrófagos do fígado .....	24
d)	Cultura primária de macrófagos.....	25
e)	<i>Cytospins</i> .....	26
f)	Imunodeteção de antígenos de VDHC .....	26
g)	Marcação simples de macrófagos e dupla de VDHC e actina .....	27
h)	Marcação dupla de VDHC e macrófagos.....	28
i)	Quantificação relativa de <i>mRNA</i> de citocinas e quimiocinas produzidas pelos macrófagos em cultura .....	29
1.	Extração de <i>RNA</i> .....	29
2.	Conversão de <i>RNA</i> .....	30
3.	<i>PCR</i> quantitativo em tempo real.....	30
j)	Doseamento de citocinas e quimiocinas produzidas pelos macrófagos em cultura por <i>ELISA</i> .....	32
IV.	Ensaio <i>in vitro</i> – Co-cultura de macrófagos alveolares com linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	33
a)	Colheita de amostras biológicas .....	33
b)	Isolamento de macrófagos alveolares.....	33
c)	Isolamento de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> com <i>beads</i> magnéticas.....	34
d)	Co-cultura de macrófagos alveolares com linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	35
e)	Imunodeteção de antígeno de VDHC.....	36
f)	Quantificação relativa de <i>mRNA</i> de citocinas e quimiocinas produzidas pelos macrófagos e linfócitos T em co-cultura.....	36
g)	Doseamento de IFN $\gamma$ produzido pelos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> em co-cultura com macrófagos por <i>ELISA</i> .....	36
h)	Doseamento de Nitritos pelo teste de <i>Griess</i> .....	37
V.	Análise Estatística .....	37
	Resultados.....	38
I.	Ensaio <i>in vitro</i> – Cultura primária de macrófagos .....	38
a)	Imunodeteção de VDHC no fígado e quadro lesional.....	38
b)	Identificação de macrófagos nas suspensões broncoalveolares e de fígado .....	39
c)	Deteção do VDHC nos macrófagos .....	41
d)	Quantificação da expressão relativa de <i>mRNA</i> de mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos em cultura.....	44
e)	Doseamento de mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos em cultura.....	50
II.	Ensaio <i>in vitro</i> – Co-cultura de macrófagos alveolares com linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	53
a)	Imunodeteção de VDHC no fígado e quadro lesional.....	53
b)	Quantificação relativa de <i>mRNA</i> de mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos e linfócitos T em co-cultura .....	54

c) Doseamento de $\text{IFN}\gamma$ e Óxido Nítrico nos sobrenadantes da co-cultura: macrófagos / linfócitos T $\text{CD4}^+$ ou T $\text{CD8}^+$ .....	56
Discussão .....	58
Conclusão.....	64
Perspetivas Futuras.....	66
Referências Bibliográficas.....	67

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Micrografia eletrónica de partículas de VDHC .....	3
<b>Figura 2</b> - Organização genómica do VDHC .....	3
<b>Figura 3</b> - Fotografia representativa das lesões que se observam na necropsia de um coelho adulto morto com DHC .....	8
<b>Figura 4</b> - Heterogeneidade dos macrófagos .....	14
<b>Figura 5</b> - Heterogeneidade das funções dos macrófagos na inflamação .....	16
<b>Figura 6</b> - Microscopia ótica de cortes histológicos de fígado - marcação para o VDHC .....	39
<b>Figura 7</b> - Microscopia de fluorescência dos <i>cytopins</i> – marcação para macrófagos...40	
<b>Figura 8</b> - Microscopia de fluorescência dos <i>cytopins</i> – marcação para VDHC e actina.....42	
<b>Figura 9</b> - Microscopia de fluorescência dos <i>cytopins</i> – marcação para VDHC e macrófagos.....43	
<b>Figura 10</b> - Expressão relativa de <i>mRNA</i> dos mediadores inflamatórios (2 horas de cultura).....45	
<b>Figura 11</b> - Expressão relativa de <i>mRNA</i> dos mediadores inflamatórios (2 horas de cultura).....46	
<b>Figura 12</b> - Expressão relativa de <i>mRNA</i> dos mediadores inflamatórios (6 horas de cultura).....48	
<b>Figura 13</b> - Expressão relativa de <i>mRNA</i> dos mediadores inflamatórios (26 horas de cultura).....50	
<b>Figura 14</b> - Doseamento dos mediadores inflamatórios – (2 horas de cultura) .....51	
<b>Figura 15</b> - Doseamento das citocinas proinflamatórias (IL1 e TNF $\alpha$ ) e quimiocinas (CCL2) – (2 horas de cultura) .....52	
<b>Figura 16</b> - Doseamento dos mediadores inflamatórios – (26 horas de cultura) .....53	
<b>Figura 17</b> - Expressão relativa de <i>mRNA</i> dos mediadores inflamatórios (72 horas de co-cultura).....56	
<b>Figura 18</b> - Doseamento de IFN $\gamma$ às 72 horas de co-cultura.....57	

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Lesões macro e microscópicas causada pelo VDHC.....	8
<b>Tabela 2</b> - Sequências dos <i>primers</i> ( <i>Forward</i> e <i>Reverse</i> ), tamanho do amplicão e <i>mRNA</i> <i>acession number</i> dos genes usados como genes de referência e das citocinas e quimiocinas analisadas.....	31
<b>Tabela 3</b> - Temperatura de <i>Annealing</i> específica dos <i>primers</i> dos genes de referência e das citocinas e quimiocinas analisadas.....	32

## Lista de Abreviaturas

*ABC – Avidin-Biotin Complex*

*AP-1 – Activator Protein 1*

*BALT – Bronchus Associated Lymphoid Tissue*

*BLAST – Basic Local Alignment Search Tool*

*BSA – Bovine Serum Albumin*

*CCL2 – Quimiocina (motivo C-C) ligando 2*

*CCL3 – Quimiocina (motivo C-C) ligando 3*

*CD127a – Recetor do Cluster of Differentiation 47*

*CD200R – Recetor do Cluster of Differentiation 200*

*CD4 – Cluster of Differentiation 4*

*CD8 – Cluster of Differentiation 8*

*CD86 – Cluster of Differentiation 86*

*cDNA – complementary Deoxyribonucleic Acid*

*DAB – 3,3'- Diaminobenzidina*

*DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole*

*DHC – Doença Hemorrágica do Coelho*

*DNA – Deoxyribonucleic Acid*

*DNase – Deoxyribonuclease*

*DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

*EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid*

*ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

*FBS – Fetal Bovine Serum*

*FITC – Fluorescein isothiocyanate*

*GNB2L1 – Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Beta Polypeptide 2-Like 1*

*gRNA – genomic Ribonucleic Acid*

*HBGA – Histo-Blood Group Antigens*

*HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic Acid*

*HPRT1 – Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*

*HRP – Horseradish Peroxidase*

*HSC – Haematopoietic Stem Cell*

*ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar*

*IFN $\alpha$  – Interferão *alpha**

*IFN $\gamma$  – Interferão *gamma**

*IL1 – Interleucina 1*

*IL10 – Interleucina 10*

*IL13 – Interleucina 13*

*IL4 – Interleucina 4*

*IL6 – Interleucina 6*

*iNOS – inducible Nitric Oxide Synthase*

*LPS – Lipopolissacarídeo*

*LTA – Lipoteichoic Acid*

*MCP-1 – Monocyte Chemoattractant Protein-1*

*MHC – Major histocompatibility complex*

*MIP-1 $\alpha$  – Macrophage-Inflammatory Protein-1 *alpha**

*mRNA – messenger Ribonucleic Acid*

*NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

*NED – N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride*

*NF- $\kappa$ B – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

*NO – Nitric Oxide*

*NTC – No template control*

*ORF1/2 – Open Reading Frame 1/2*

*PBS – Phosphate Buffered Saline*

*PCR – Polymerase Chain Reaction*

*PGE2 – Prostaglandina E2*

*PGN – Peptidoglicano*

*qPCR – Real-time Polymerase Chain Reaction*

*RCV – Rabbit Calicivirus*

*RCV-A1 – Rabbit Calicivirus Australia 1*

*RdRp – RNA-dependent RNA polymerase*

*RNA – Ribonucleic Acid*

*RNase – Ribonuclease*

*ROS – Reactive Oxygen Species*

*RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium*

*RT – Reverse transcriptase*

*RT-qPCR – Reverse transcription real-time Polymerase Chain Reaction*

*sgRNA – subgenomic Ribonucleic Acid*

*SPF – Specific Pathogen Free*

*TGF $\beta$  – Transforming Growth Factor beta*

*Th1 – T helper 1*

*TLR – Toll-like receptors*

*TMB – 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina*

*TNF – Tumor Necrosis Factor*

*UHA – Unidades Hemaglutinantes*

*UMIB – Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica*

*UP – Universidade do Porto*

*USA – United States of America*

*VDHC – Vírus da Doença Hemorrágica do Coelho*

*VP10 – Viral Protein 10*

*VP60 – Viral Protein 60*



# Introdução

## I. Doença Hemorrágica do Coelho

A Doença Hemorrágica do Coelho (DHC) é uma doença infecciosa provocada por um vírus da família *Caliciviridae*, denominado Vírus da Doença Hemorrágica do Coelho (VDHC) [1]. Esta doença, altamente contagiosa, afeta coelhos domésticos e selvagens da espécie *Oryctolagus cuniculus*, sendo geralmente fatal para os animais adultos e portanto, responsável pela diminuição mundial do número de coelhos [2].

### a) Distribuição geográfica e Relevância

Foi descrita pela primeira vez em 1984, na província de Jiangsu, na República Popular da China, num grupo de coelhos Angorá importados da Alemanha [3]. Em menos de 9 meses, a DHC espalhou-se por uma área de aproximadamente 50 000 km<sup>2</sup>, dizimando grande parte dos coelhos [4]. A doença alcançou a Europa, mais concretamente a Itália [5] em 1986, país a partir do qual se espalhou para o resto do continente, tornando-se endémica em vários países. Na Península Ibérica, região onde o coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus*) é uma espécie nativa e desempenha um papel chave no ecossistema [6], os primeiros relatos surgiram em 1988 em Espanha [7] e em 1989 em Portugal [8], tendo sido responsável por uma diminuição dramática do número de coelhos nesta região do mundo [9]. Ocorreram também surtos da doença em vários países no Norte de África [10], na América do Sul, mais exatamente no México, o único país que conseguiu erradicar a doença [11], e mais tarde na América do Norte [12].

O impacto da DHC nas populações mundiais de coelhos aquando do seu surgimento despertou de imediato um grande interesse na Austrália e Nova Zelândia, dado que nestes países o coelho europeu, indevidamente introduzido no século XIX, constitui uma praga agrícola e uma ameaça para a fauna e flora locais, provocando sérios prejuízos económicos e no ecossistema [13]. Consequentemente foi considerado que o VDHC poderia ser um bom agente biológico controlador da espécie [14], pelo que em 1991 foi iniciado na Austrália, um programa de investigação científica no âmbito da DHC. Todavia não chega a fazer-se uma dispersão controlada do agente, pois durante o curso destes trabalhos, em 1995, o vírus escapou acidentalmente de um laboratório para o ecossistema [15], espalhando-se pelo sul do país. Numa fase inicial, causou o impacto desejado, ou seja uma redução de mais de 95% de algumas populações de

coelhos, mas mais tarde a taxa de mortalidade veio a reduzir significativamente, o que deu lugar a numerosas publicações que tentavam explicar este fenómeno [16]. Na Nova Zelândia, apesar do governo ter proibido a introdução do vírus [14], este acabou por ser introduzido ilegalmente, em 1998 [17].

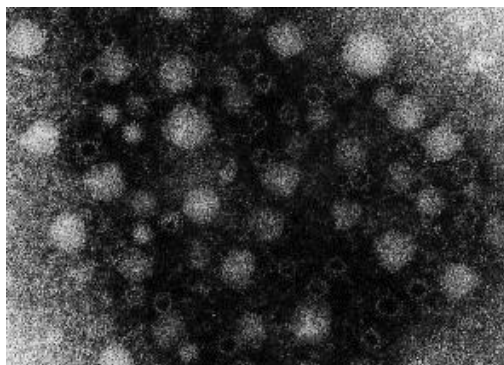
Atualmente, a DHC encontra-se dispersa por todo o mundo [18], continuando a ocorrer surtos em quase todos os continentes, com taxas de mortalidade significativas, sendo endémica em várias áreas da Europa e Ásia, bem como, em algumas zonas de África, Austrália e Nova Zelândia [19]. A sua prevalência, principalmente nos países do sul da Europa como Portugal e Espanha, tem sido considerada responsável por perdas económicas muito importantes, pois nesta região a carne de coelho faz parte da dieta tradicional e a caça é atualmente um setor económico em expansão. Acrescem a estes prejuízos económicos, os desequilíbrios graves que a diminuição do número de populações de coelho bravo gera no ecossistema ao constituir-se como presa de vários predadores Ibéricos, incluindo duas espécies ameaçadas de extinção: o lince-ibérico (*Lynx pardinus*) e a águia-imperial-ibérica (*Aquila adalberti*) [6].

A DHC tornou-se, deste modo, um tema interessante para a investigação científica, tendo-se verificado ainda que esta constituía uma ferramenta valiosa, como modelo de estudo para outras febres hemorrágicas virais, como o Ébola [20], bem como, para o desenvolvimento de terapias contra outros patógenos e até mesmo contra o cancro [19].

## b) Agente Etiológico da DHC

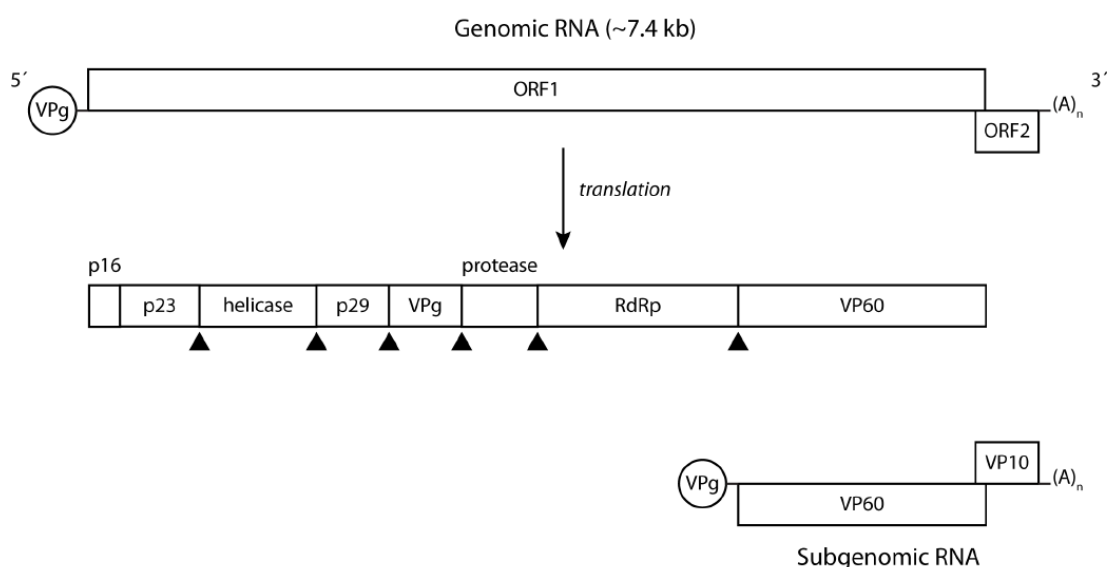
O agente causador da DHC foi identificado, no início da década de 90, como sendo um membro da família *Caliciviridae*, com base nas suas características morfológicas, físico-químicas e sequência nucleotídica [21-23]. No entanto, a identificação deste vírus não foi fácil, chegando mesmo a ser considerado em 1988, um picornavírus [24] em 1989, um parvovírus [25] e em 1991, um *parvo-like* vírus [4], antes de se chegar a um consenso sobre a sua identificação. Em 1998, foi designado pelo comité internacional para nomenclatura dos vírus como Vírus da Doença Hemorrágica do Coelho [1] e atualmente é classificado como pertencente ao género *Lagovirus*, família *Caliciviridae* [26].

Os viriões do VDHC são esféricos, de pequeno tamanho (35-40 nm de diâmetro), não possuem invólucro e apresentam uma cápside icosaédrica com depressões em forma de taça, que protege o material genético (Figura 1) [27, 28] .



**Figura 1** - Micrografia eletrônica de partículas de VDHC. A morfologia típica do calicivírus é retratada, nomeadamente partículas virais com forma esférica, de pequeno tamanho (35-40nm) e que apresentam depressões em forma de taça (53000x), adaptado de [28].

Estes viriões contêm ácido ribonucleico (*RNA* do inglês *ribonucleic acid*) genómico (*gRNA*), bem como, um *RNA* adicional, com 2,2 kb que se designa por *RNA* subgenómico (*sgRNA*) e é colinear com a extremidade 3' do *RNA* genómico [23, 29]. Este *sgRNA* codifica produtos necessários durante a fase intermédia e fase final da infeção, tal como proteínas estruturais [30]. O *gRNA* consiste numa cadeia de *RNA* simples e positiva, constituída por 7437 nucleótidos (aproximadamente 7,4 kb). Neste fragmento, é possível encontrar duas *Open Reading Frames* designadas de *ORF1* e *ORF2* (Figura 2). A *ORF1*, que compreende os nucleótidos 10 a 7044, codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada, em proteínas não estruturais (incluindo a p16, p23, helicase, p29, VPg, uma protease e a *RNA* polimerase dependente de *RNA*, *RdRp*, do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*) e na principal proteína estrutural da cápside, a VP60, com cerca de 60 kDa. A *ORF2*, que compreende os nucleótidos 7025 a 7378, codifica para a proteína estrutural da cápside, VP10 (Figura 2) [23, 29, 31].



**Figura 2** - Organização genómica do VDHC, adaptado de [19].

A *VP60* constitui o principal alvo na defesa imunológica do hospedeiro contra a DHC e desempenha um papel importante no diagnóstico e vacinação [32]. Relativamente à *VP10*, foi recentemente mostrado que esta aumenta os níveis de replicação do vírus e que promove a apoptose [33], o que sugere que esta proteína seja responsável pela regulação da replicação viral, bem como, pela libertação de viriões a partir das células hospedeiras infetadas [34].

## c) Estirpes patogénicas e não-patogénicas do VDHC

### 1. Estirpes patogénicas

A origem e evolução do VDHC não são bem compreendidas [19], no entanto, a evolução do VDHC parece seguir uma ordem cronológica e não um padrão geográfico tendo sido definidos seis grupos genéticos (G1 a G6) [35, 36]. Inicialmente, foram apenas estabelecidos três grupos genéticos (G1, G2 e G3) [35] e mais tarde identificaram três novos genogrupos (G4, G5 e G6), em que o grupo G4 evoluiu do grupo G3 e o G5 surgiu como um novo grupo independente [36]. Interessantemente, o grupo genético G6 correspondeu à primeira variante antigénica de VDHC, detetada por Capucci e coautores, designada por VDHCa. Esta variante, embora apresente o mesmo nível de patogenicidade que as outras, apresenta um perfil antigénico distinto e diferenças genéticas características [37].

Na Península Ibérica, ao contrário do que aconteceu nos restantes países da Europa em que os grupos genéticos foram sucessivamente substituídos, apenas estirpes do grupo genético G1 foram detetadas [38, 39].

No geral, com a exceção do VDHCa, a evolução do VDHC está associado com um elevado grau de homogeneidade genética, com um máximo de diferença de nucleótidos e aminoácidos de 10% e 6%, respetivamente [19]. Esta homologia poderá resultar da rápida propagação do vírus mas também do facto de o vírus ser um patógeno relativamente recente [19, 40]

### 2. Estirpes não-patogénicas

A existência de estirpes de VDHC não patogénicas foi estabelecida em 1996, quando uma estirpe não letal semelhante ao VDHC, mas geneticamente distinta, foi isolada numa exploração de coelhos em Itália [41]. Esta estirpe, designada *RCV* (do

inglês *rabbit calicivirus*), difere do VDHC pelo seu tropismo, carga viral e sequência genética que codifica para a proteína da cápside. Subsequentemente, estirpes aparentemente não patogénicas foram detetadas após o isolamento de fragmentos de RNA viral em coelhos domésticos ou selvagens saudáveis do Reino Unido e Irlanda [42-44]. Mais recentemente, um estudo reportou a existência a uma estirpe não patogénica RCV-A1, na Austrália [45]. Esta estirpe tem a capacidade de gerar anticorpos com reatividade cruzada para o VDHC e posteriormente, protege parcialmente os animais da DHC, podendo oferecer a justificação para a menores taxas de mortalidade por DHC que se vieram a registar neste país [45]. Outras estirpes, no entanto, não conferem qualquer tipo de proteção [46, 47].

Até agora, o isolamento de estirpes não patogénicas já revelou diferenças significativas entre estas estirpes e as patogénicas, sendo que para além da patogenicidade, destaca-se o diferente tropismo e a variabilidade da cápside [19].

#### d) Infecção e Transmissão do VDHC

A infecção natural pelo VDHC pode suceder através das vias oral, nasal e conjuntival [48, 49], podendo a transmissão ocorrer pelo contacto direto com animais infetados, uma vez que as partículas virais estão presentes nas suas secreções e excreções [50], ou indiretamente, através do contacto com água, alimentos e qualquer outro material contaminado [14]. A transmissão mecânica, através de vetores como mamíferos necrófagos, aves e insetos, está também documentada [49, 51, 52].

A transmissão indireta do VDHC assume particular relevância na dispersão da doença, uma vez que o vírus é bastante estável e resistente ao ambiente exterior. A sua capacidade de infecção não é reduzida pelo tratamento com éter ou clorofórmio, tripsina, exposição a pH 3,0 ou por aquecimento a 50°C durante 1 hora [53]. Em adição, o vírus conserva a sua capacidade de infecção a baixas temperaturas e mantém-se estável após ciclos de congelação e descongelação. É inativado por hidróxido de sódio a 10%, formaldeído a 1,0-1,4% e por hipoclorito de sódio a 10% [54]. Estudos mais recentes mostraram também que o VDHC, quando presente em tecidos animais, tais como carcaças de coelhos infetados, pode sobreviver pelo menos 3 meses, enquanto o vírus diretamente exposto às condições ambientais é viável por um período inferior a um mês. Deste modo, as carcaças de coelhos infetados com VDHC podem ser uma importante fonte de propagação viral, devido à elevada resistência e estabilidade do vírus nestas condições [55].

## e) Sinais Clínicos e Quadro Patológico

A DHC apresenta uma evolução clínica dramática, uma vez que provoca a morte a cerca de 90% dos coelhos adultos infetados entre 24 a 72 horas após a infeção viral. Esta doença é principalmente caracterizada por uma hepatite fulminante, acompanhada por um quadro hemorrágico resultante de uma coagulação intravascular disseminada [56-58].

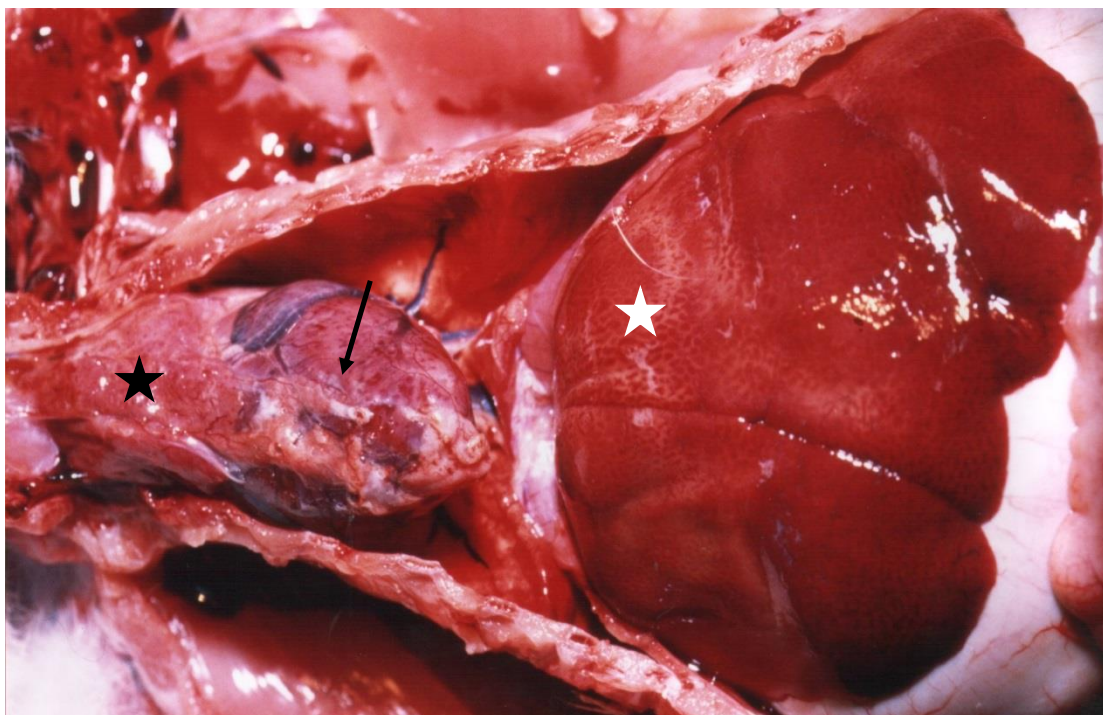
Existem três formas distintas de doença, tendo em conta os quadros clínicos que a mesma apresenta: a hiperaguda, a aguda e a subaguda. A forma hiperaguda identifica-se por induzir morte súbita, sem sinais clínicos prévios, enquanto a forma aguda pode envolver, poucas horas antes da morte do animal, a presença de depressão, anorexia, apatia, febre, respiração rápida, anemia, sintomas neurológicos, tais como convulsões, ataxia e paralisia, e por vezes, sinais de desconforto abdominal. Pode também ocorrer congestionamento da conjuntiva palpebral bem como hemorragia nasal e ocular. Nesta forma de infeção, à semelhança do que acontece também na hiperaguda, os animais perecem 1 a 3 dias após infeção. A forma subaguda envolve sintomas clínicos leves, sendo comum a presença de icterícia, e os animais podem recuperar findos vários dias de evolução da infeção [48, 57, 59].

O quadro de hepatite fulminante é consequente à infeção dos hepatócitos pelo vírus que são considerados a célula-alvo de replicação viral, muito embora também se detetem antigénios virais nos macrófagos de vários órgãos, nomeadamente no baço e nos pulmões de coelhos infetados [60-63]. A insuficiência hepática que se estabelece resulta em desequilíbrios hemodinâmicos vários, nomeadamente em défice de vários fatores de coagulação. Este, juntamente com o quadro de coagulação intravascular disseminada [56-58] que entretanto se estabelece, dão lugar ao estabelecimento de hemorragias mais ou menos extensas em vários órgãos, e consequente falência multiorgânica, que redundam em morte dos coelhos com DHC [64]. As principais alterações patológicas e histopatológicas que podem ser observadas após uma infeção pelo VDHC encontram-se sumariadas na Tabela 1 [19]. Na Figura 3 é possível observar algumas lesões macroscópicas características de DHC, nomeadamente hepatomegalia, descoloração do fígado e hemorragias multifocais em vários órgãos.

Órgão	Macroscópicas	Microscópicas
<b>Fígado</b>	<p>Perda de consistência - friável</p> <p>Ligeiro aumento, com lobulação marcada</p> <p>Alterações de cor (amarelo pálido/acinzentado)</p> <p>Superfície, por vezes, ligeiramente granular</p>	<p>Degenerescência/necrose hepatocelular grave e generalizada (vacuolização extensa do citoplasma; núcleo – cariorréxis, picnose, cariólise)</p> <p>Infiltrado de granulócitos nos espaços porta, sinusoides e zonas interlobulares</p> <p>Ativação das células de <i>Kupffer</i></p> <p>Esteatose microvascular</p> <p>Depleção dos grânulos de glicogénio</p> <p>Alterações graves na estrutura das mitocôndrias</p>
<b>Pulmões</b>	<p>Congestão e edema pulmonar</p> <p>Hemorragias multifocais difusas e petequiais</p>	<p>Hemorragias alveolares e perivasculares</p> <p>Microtrombos nos capilares alveolares</p> <p>Edema alveolar</p> <p>Cariorréxis nos <i>BALT (Bronchus associated lymphoid tissue)</i></p>
<b>Traqueia</b>	<p>Hiperemia da mucosa</p> <p>Hemorragias difusas ou petequiais</p> <p>Lúmen com fluido espumoso e sanguinolento</p>	<p>Hiperemia da mucosa traqueal</p> <p>Infiltrados leucocitários</p> <p>Calcificação da cartilagem traqueal</p>
<b>Baço</b>	<p>Coloração vermelho escuro matizado</p> <p>Esplenomegalia e hiperemia</p>	<p>Necrose hialina da polpa vermelha</p> <p>Ocasional cariorréxis nos folículos e linfopenia</p> <p>Hemossiderose</p> <p>Artérias foliculares com microtrombos hialinos</p>
<b>Rins</b>	<p>Aumento e hiperemia</p> <p>Coloração vermelho escuro matizado</p>	<p>Microtrombos hialinos nos capilares glomerulares</p> <p>Hemorragias na medula renal e nos glomérulos</p> <p>Degenerescência do epitélio tubular</p> <p>Infiltrados linfocitários</p> <p>Dilatação dos túbulos</p>
<b>Trato gastro-intestinal</b>	<p>Gastrite catarral com lesões na mucosa</p> <p>Hemorragias – subserosa</p>	<p>Degenerescência das criptas do intestino delgado e consequente atrofia das vilosidades intestinais</p>

<b>Coração</b>	Petéquias no miocárdio	Necrose focal do miocárdio Hemossiderose
<b>Gânglios linfáticos</b>	Hiperplasia dos gânglios linfáticos mesentéricos Ocasionalmente, hiperemia	Cariorréxis e depleção dos linfócitos, nos restantes gânglios linfáticos
<b>Timo</b>	Hemorragias difusas ou petequias	Apoptose dos linfócitos
<b>Sistema nervoso central</b>	Congestão dos vasos corticais Hiperemia Hemorragias ocasionais no córtex	Edema intramielínico e microtrombos Ocasionalmente, encefalomielite não-purulenta com infiltrados linfocitários

**Tabela 1** - Lesões macro e microscópicas causada pelo VDHC, adaptado de [19].



**Figura 3** - Fotografia representativa das lesões que se observam na necropsia de um coelho adulto morto com DHC. Estas alterações consistem em lesões hepáticas (aumento de tamanho, descoloração e lobulação marcada – estrela branca) e hemorragias generalizadas, aqui evidentes no timo (estrela preta) e coração (seta).

No fígado, as alterações ultra-estruturais que se observam são uma extensa vacuolização dos hepatócitos, associada a alterações graves na estrutura das mitocôndrias e depleção de grânulos de glicogénio [65], alterações que se traduzem num aumento substancial e abrupto das transaminases hepáticas [66]. Ao microscópio eletrónico é também evidente a presença de infiltrados leucocitários, predominantemente, heterófilos, dispersos pelo órgão [67].



## f) Prevenção, Controlo e Vacinação da DHC

A terapia que é conferida pela inoculação de um soro hiperimune é apenas de curto prazo e mostra-se ineficaz em animais que apresentam sinais clínicos. Deste modo, ainda não existe uma cura disponível para animais que já tenham contraído a doença e estejam a morrer. Assim, as medidas de prevenção e controlo da doença através da biossegurança e vacinação são de extrema importância [19, 68]. No que diz respeito às vacinas, as que estão comercialmente disponíveis foram produzidas a partir de homogeneizados de fígado de coelhos infetados, seguido de uma inativação química do vírus [54, 68, 69]. No entanto, para minimizar os riscos inerentes ao fabrico e uso deste tipo de vacinas, a proteína da cápside do VDHC, a *VP60*, tem sido testada em vários estudos com vista ao desenvolvimento de uma vacina de subunidade. Vários sistemas de expressão heteróloga ou vírus animais recombinantes tem sido desenvolvidos para produzir proteína *VP60* recombinante, sendo que a maioria destes sistemas mostrou ser imunogénico e conferiu proteção contra uma dose letal de VDHC por desenvolverem uma resposta humoral, indicando que estas poderão ser, no futuro, bons substitutos das vacinas comerciais [19].

Apesar dos seus riscos biológicos, as vacinas comerciais existentes são eficazes em unidades de produção de coelhos mas a vacinação dos coelhos selvagens continua a ser económica e logisticamente inviável [70], ainda mais porque teria de ser realizada de uma forma regular, uma vez que a imunidade induzida não dura mais do que um ano [71].

Tendo em conta os riscos biológicos inerentes às vacinas inativadas e as limitações relativamente à administração das mesmas em coelhos selvagens, as medidas de biossegurança para o controlo e prevenção da DHC, tais como, a vigilância, saneamento, desinfeção e quarentena são de extrema importância para limitar a propagação da doença e garantir a sua prevenção, sobretudo nos países onde circula o VDHC e a doença não foi erradicada [19].

## g) Mecanismos de Resistência da DHC

Uma das características mais interessantes da DHC prende-se com o facto dos coelhos jovens (até às 4 semanas de idade) serem naturalmente resistentes à infeção causada pelo VDHC, ou seja, ao mesmo vírus que é capaz de matar 90% dos coelhos adultos infetados em 3 dias ou menos [2, 57]. Efetivamente, os coelhos jovens não apresentam quaisquer sinais clínicos associados à infeção pelo VDHC [28], embora se

saiba que é possível documentar nestes animais uma diminuição aguda e transitória de heterófilos circulantes, bem como, uma lesão hepática focal associada à presença de infiltrados inflamatórios moderados, que inicialmente são constituídos por heterófilos e posteriormente, por células mononucleares (linfócitos e macrófagos) [28, 67, 72]. Para além destas alterações, destaca-se ainda um aumento transitório e moderado das transaminases hepáticas justificado pela lesão hepatocelular moderada que se observa neste grupo etário [28]. Interessantemente, se estes animais forem infetados em idade jovem serão resistentes à infeção em idade adulta, o que sugere que o sistema imune destes coelhos jovens é capaz de reconhecer o vírus e produzir anticorpos específicos anti-VDHC, que os irão proteger contra a DHC na idade adulta, numa situação de reinfeção [73]. Trabalho desenvolvido anteriormente na infeção de coelhos jovens com o VDHC permitiu perceber que a suscetibilidade dos coelhos à doença aumenta gradualmente entre as 4 e as 8 semanas, altura em que a maioria dos coelhos começa a morrer com a infeção (dados não publicados do grupo de investigação do ICBAS/UP e UMIB).

Conhecer os mecanismos fisiopatológicos que são desencadeados nestes hospedeiros, e que lhes permite resistir ou não à infeção, tem sido um tema central no estudo da patogénese da DHC [74]. Neste sentido, um estudo reportou que o VDHC é capaz de se ligar a antigénios do grupo histo-sanguíneo (*HBGA*, do inglês *Histo-Blood Group Antigens*) que são expressos na mucosa do trato respiratório superior e digestivo dos coelhos, sendo que a densidade desses fatores de ligação nas células da mucosa foi considerada essencial para que os animais adultos fossem suscetíveis à infeção pelo VDHC. A reforçar este postulado os mesmos autores encontraram uma ligação fraca de partículas virais na mucosa dos mesmos tecidos em coelhos jovens, indicando assim que a baixa expressão de *HBGA* poderia explicar a resistência dos coelhos jovens à DHC [75]. No entanto, e apesar destas evidências, recentemente, o mesmo grupo reportou que a baixa expressão destes fatores, que chamaram de facilitadores da infeção, ao nível epitelial, apenas confere proteção parcial à infeção pelo VDHC [19, 76], tendo também mostrado que os hepatócitos, células alvo de replicação viral, não expressam *HBGA* [75, 76], o que os levou a sugerir a existência de recetor(es) hepáticos adicionais para o vírus [19]. Paralelamente a estas publicações, o grupo de investigação deste laboratório demonstrou que os coelhos jovens infetados com o VDHC, por via intramuscular, desenvolvem uma doença semelhante à observada nos coelhos jovens infetados com VDHC por via natural (oral ou nasal) [62, 72, 77], o que levou este grupo a sugerir que a resistência dos coelhos jovens à DHC poderá ser dependente de outros fatores [78].

De facto, é possível identificar algumas diferenças na fisiopatologia da DHC dos coelhos jovens e adultos que podem ajudar a explicar o porquê da infeção viral ter um desfecho diferente em ambos grupos etários. Nomeadamente, nos coelhos jovens regista-se um baixo número de hepatócitos infetados pelo vírus [62, 77] enquanto nos coelhos adultos o vírus é detetado de forma generalizada no fígado [62], sendo que, conforme referido anteriormente, após a infeção surge nos coelhos jovens uma diminuição transitória dos heterófilos circulantes [28] que contrasta com a leucopenia severa que se verifica nos coelhos adultos [65]. Para além destas diferenças, está também documentado que os coelhos adultos infetados apresentam uma diminuição tanto de linfócitos B como T, não só no fígado como também no baço, e que essa depleção está associada a uma apoptose severa destas populações celulares [79]. Outros autores mostraram ainda que a infeção por VDHC nestes animais está associada a um aumento significativo dos níveis de *mRNA* de citocinas proinflamatórias no fígado [80, 81]. Adicionalmente, estudos não publicados por este laboratório mostraram também um aumento abrupto de citocinas proinflamatórias no soro dos coelhos adultos, poucas horas antes da morte. Em oposição, os coelhos jovens após infeção desenvolvem uma resposta inflamatória rápida e eficaz, a qual é acompanhada por um aumento sustentado de linfócitos T e B quer a nível hepático, como a nível sistémico [74]. Foi ainda documentado por este laboratório que as células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), população que tem um papel importante na resposta inflamatória, estavam diminuídas no baço de coelhos adultos infetados enquanto nos coelhos jovens infetados não se registaram diferenças [82]. Todos estes dados sugerem que os coelhos jovens e adultos desenvolvem uma resposta imune diferente após a infeção com VDHC que se traduz em quadros clínicos de DHC opostos. Mais exatamente, nos coelhos adultos o vírus poderá ser capaz de induzir a supressão da resposta imune inata do hospedeiro, que facilitará a sua disseminação num curto espaço de tempo e por conseguinte, a morte por DHC.

Suportados nestes conhecimentos, recentemente este laboratório demonstrou que se os coelhos jovens forem imunossuprimidos experimentalmente e posteriormente infetados com VDHC, nas mesmas condições experimentais, morrem até às 72 horas após a infeção, com sinais de morte por DHC [78]. Efetivamente também o quadro histopatológico é compatível com a DHC, tendo sido provada a infeção generalizada dos hepatócitos por VDHC associada a um título viral elevado, semelhante ao apresentado pelos coelhos adultos vítimas de DHC, bem como, um aumento exacerbado de citocinas proinflamatórias (TNF $\alpha$  e IL6), também observado no mesmo grupo etário. Com estes resultados foi possível reforçar que a interação entre o vírus e

os sistemas imune inato e adaptativo de coelhos jovens e adultos apresentará diferenças significativas que podem culminar com um desfecho diferente da DHC [78].

## h) Os macrófagos na fisiopatologia da DHC

O hepatócito é tido como a célula-alvo de replicação do VDHC, como referido anteriormente [60-63]. No entanto, estudos realizados no âmbito da DHC mostram que é possível detetar o VDHC também nos macrófagos (células de *Kupffer*, macrófagos alveolares e esplénicos) e monócitos circulantes [83]. A presença do vírus nestas células é controversa, ou seja, alguns artigos sugerem que o vírus infeta e replica-se nos macrófagos, já que foi detetada a presença de *RNA* viral de cadeia simples positiva e negativa [63], enquanto outros, não excluem a hipótese do vírus ser somente internalizado por estes como resultado da fagocitose de células infetadas, não havendo lugar a replicação viral [84]. Adicionalmente existem artigos que atribuem aos macrófagos o papel da disseminação viral, sugerindo por conseguinte, que os macrófagos alveolares, os quais se encontram em contato direto com a corrente sanguínea, possam ser importantes para a disseminação inicial do VDHC e mais tarde quando atinge o fígado, as células de *Kupffer* possam ser responsáveis pela disseminação para os restantes órgãos [63]. Acresce a esta discussão, a necessidade de se clarificarem outros aspetos sobre o papel destas células na fisiopatologia da infeção.

De facto, é bem conhecido que os macrófagos têm um papel chave no controle precoce de infeções, nomeadamente contribuindo para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa a infeções virais [85]. Estas células participam na resposta antiviral através da produção de citocinas inflamatórias [86-88] e síntese de radicais livres, como o óxido nítrico, com efeitos antivirais [89, 90], sendo também possível que contribuam para a defesa antiviral via fagocitose de vírus e células apoptóticas infetadas [86, 91]. Em adição, os macrófagos têm a capacidade de suprimir a replicação de alguns vírus [92] e a depleção destas células resulta, em alguns casos, num elevado título viral [93], o que reforça a importância dos macrófagos no controlo de vírus [92, 93]. No entanto, e paradoxalmente, é também sabido que em algumas febres hemorrágicas virais, como as induzidas pelos vírus Ébola e Marburgo, os macrófagos poderão suprimir a resposta imune do hospedeiro contra o vírus, contribuindo para a sua disseminação sistémica [20, 94-96]. Efetivamente, na febre hemorrágica induzida pelo vírus Ébola, os aspetos centrais da fisiopatologia e do quadro clínico da doença são causados pelos efeitos da replicação viral nos macrófagos e nas células dendríticas. Os macrófagos infetados

produzem citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fator tecidual, que recrutam células inflamatórias capazes de provocarem lesão do endotélio dos vasos sanguíneos. Consequentemente, originam-se alterações na permeabilidade vascular e um quadro de coagulação intravascular disseminada, que culmina no quadro hemorrágico característico desta doença. Os macrófagos mostram-se assim incapazes de restringir a replicação viral, permitindo que o vírus se dissemine por todo o organismo e cause a morte celular em vários tecidos, o que juntamente com as hemorragias generalizadas, acaba frequentemente por terminar na morte do doente por falência multiorgânica. Também a apoptose massiva dos linfócitos, observada nesta doença, parece ocorrer devido aos efeitos dos mediadores pró-inflamatórios e à perda de capacidade das células dendríticas funcionarem como células apresentadoras de antígenos, contribuindo assim para a imunossupressão através do enfraquecimento da resposta imune adaptativa [20, 94, 95]. Também a febre hemorrágica causada pelo vírus Marburgo apresenta um mecanismo semelhante, em que os macrófagos e as células dendríticas são os principais alvos da infeção viral. A infeção dos macrófagos leva à produção de mediadores pró-inflamatórios como o  $\text{TNF}\alpha$ , o que poderá induzir a apoptose dos linfócitos, contribuindo assim para a imunossupressão. Juntamente com  $\text{IL6}$  também produzida pelos macrófagos, o  $\text{TNF}\alpha$  também causa alterações na permeabilidade vascular. Tal como na febre hemorrágica induzida pelo Ébola, estes acontecimentos contribuem para uma série de disfunções sistémicas incluindo hemorragia, anomalias de coagulação e, por fim, falência multiorgânica e choque, resultando, muitas vezes, em morte [96]. É convicção deste grupo de investigação que mecanismos fisiopatológicos similares possam estar presentes nos animais adultos, suscetíveis à DHC, mas ausentes nos coelhos jovens, resistentes à infeção. É assim objetivo deste trabalho contribuir para um melhor conhecimento do papel dos macrófagos na patogénese da DHC, mais exatamente pela avaliação dos mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos de coelhos adultos infetados experimentalmente pelo VDHC. Para melhor compreensão deste tópico, segue-se nesta introdução uma curta revisão sobre estas células.

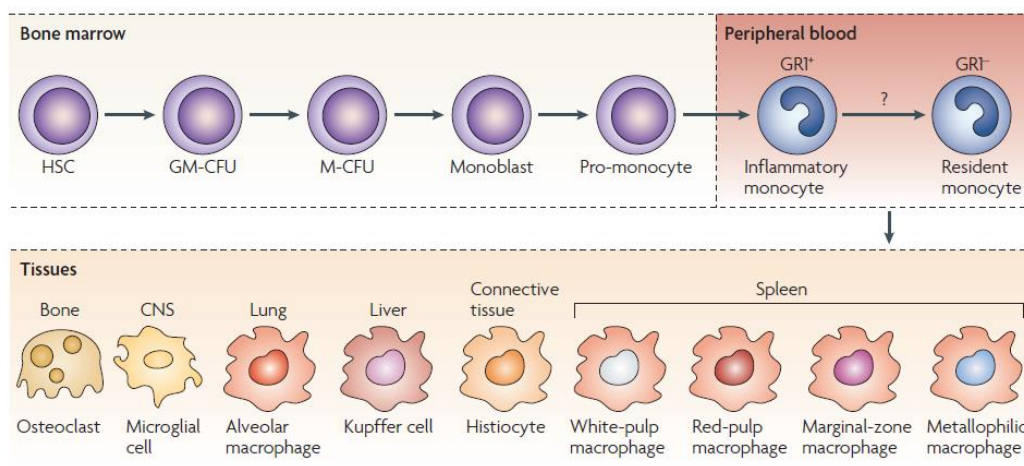
## II. Macrófagos

Os macrófagos são células fagocitárias com fenótipo diverso, derivados de monócitos circulantes e que podem ser encontrados na circulação sanguínea ou como células residentes em tecidos e órgãos [97]. Independentemente da sua localização, os macrófagos são responsáveis pela manutenção de tecidos através da *clearance*

fagocítica de células apoptóticas, micróbios, partículas estranhas, bem como, pela reparação e remodelação dos tecidos durante a cicatrização de feridas [97-99]. Os macrófagos são também os principais reguladores da resposta inflamatória, fazendo a ponte entre a imunidade inata e adaptativa, monitorizando o microambiente através dos recetores de superfície e secretando citocinas e quimiocinas apropriadas [97, 100].

### a) Origem e localização dos macrófagos

Os macrófagos diferenciam-se a partir das células mononucleares do sangue periférico, os quais migram para os tecidos no *steady-state* ou em resposta à inflamação [101]. As células mononucleares do sangue periférico desenvolvem-se a partir de um progenitor mielóide comum na medula óssea que é o precursor de vários tipos de células, incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, células dendríticas e mastócitos. Durante o desenvolvimento dos monócitos, as células progenitoras mielóides dão origem a monoblastos, pro-monócitos e finalmente, monócitos, que são lançados da medula óssea para a corrente sanguínea [101]. Os monócitos migram do sangue para os tecidos para substituir os macrófagos residentes no osso (osteoclastos), alvéolos (macrófagos alveolares), sistema nervoso central (células da microglia), tecido conjuntivo (histiócitos), trato gastrointestinal, fígado (células de *Kupffer*), rins (células mesangiais), baço e peritонеu (Figura 4) [101, 102]. Deste modo, os macrófagos estão dispersos pelo organismo, sendo que alguns tornam-se residentes em alguns tecidos, enquanto outros estão em circulação [103].



**Figura 4** - Heterogeneidade dos macrófagos. Os macrófagos são originados na medula óssea a partir de uma célula estaminal hematopoietica comum (*HSC*, do inglês *Haematopoietic Stem Cell*). Durante o desenvolvimento dos monócitos, as células progenitoras mielóides dividem-se e diferenciam-se em monoblastos e de seguida, pro-monócitos antes de se tornarem monócitos que, por sua vez, abandonam a medula óssea e entram na corrente sanguínea. Desconhece-se se os monócitos inflamatórios se diferenciam em monócitos residentes no sangue ou se estas células representam duas populações de monócitos distintas. Os monócitos migram para os diferentes tecidos onde vão substituir os macrófagos residentes; adaptado de [102].

## b) Estados de ativação dos macrófagos

Os macrófagos conseguem responder a estímulos endógenos que são gerados rapidamente após lesão ou infeção. Estes estímulos iniciais são tipicamente produzidos por células do sistema imune inato e podem exercer efeito pronunciado, embora transitório, na fisiologia dos macrófagos. Os macrófagos também têm capacidade de responder a sinais gerados por células do sistema imune adaptativo. Estes sinais são mais específicos e prolongados que os do sistema imune inato e dão origem a alterações de longo prazo nos macrófagos [104]. Em adição, os macrófagos podem produzir vários fatores que influenciam a sua própria fisiologia. Deste modo, a fisiologia dos macrófagos pode sofrer alterações após entrar em contacto com estímulos diversos [102], pelo que podem ser ativados de diferentes formas (Figura 5):

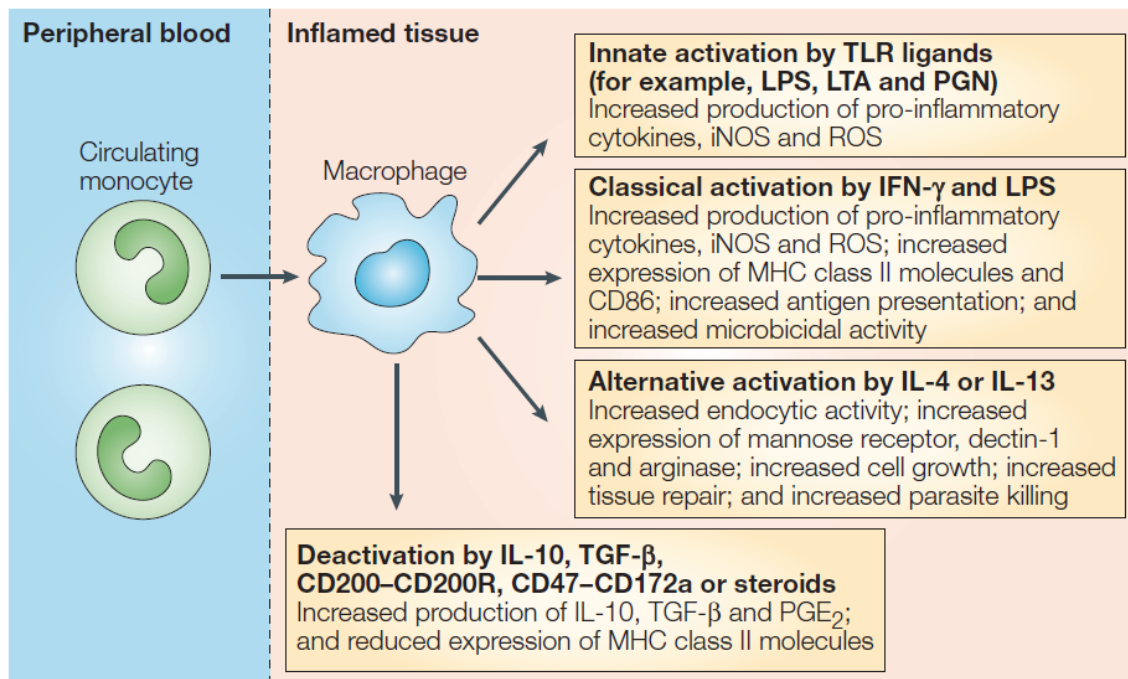
- **Ativação inata** – O contacto com moléculas microbianas como por exemplo, o lipopolissacarídeo – LPS, o ácido lipoteicoico – *LTA* (do inglês, *Lipoteichoic Acid*) e o peptidoglicano – PGN, induz uma ativação inata mediada por recetores de padrões moleculares microbianos, por exemplo os *Toll-like receptors* – *TLR*. Esta ativação está associada com a atividade microbica (produção de espécies reativas de oxigénio e azoto) e produção de citocinas próinflamatórias [101, 105].

- **Ativação clássica (Macrófagos M1)** – É induzida pela combinação dos estímulos inatos (estimulação dos *TLR* com agonistas, como por exemplo, o LPS, que induz a produção de TNF) com a ação do IFN $\gamma$ . Esta ativação resulta numa população de macrófagos com uma capacidade microbica aumentada, com expressão de altos níveis de citocinas próinflamatórias (TNF $\alpha$ , IL1 e IL6), elevada produção de espécies reativas de oxigénio e azoto, aumento da capacidade de apresentação antigénica devido à expressão aumentada de *MHC-II* e CD86 e capacidade de promoção da resposta *Th1*. Esta ativação clássica é muito mais eficaz, em termos de mediadores produzidos, que a ativação inata [101, 106, 107].

- **Ativação alternativa (Macrófagos M2)** – A exposição de macrófagos às citocinas IL4 e/ou IL13 resulta numa ativação alternativa dos mesmos. Estes macrófagos são muito ativos na atividade endocítica, expressam recetores de superfície distintos (recetor de manose e Dectina-1) e produzem arginase [101, 105]. Estes macrófagos são importantes na *clearance* de parasitas e patógenos extracelulares mas, ao contrário dos macrófagos ativados classicamente, não apresentam um aumento da explosão respiratória pelo que não são tão eficientes a matar patógenos intracelulares [105, 108, 109]. Em adição, os macrófagos deste tipo desempenham um papel importante na reparação de tecidos sendo também atribuída a designação de

macrófagos *wound-healing*, isto é, macrófagos envolvidos na cicatrização de feridas [102].

- **Desativação** – Os macrófagos podem ser desativados por citocinas anti-inflamatória como a IL10 e o TGF $\beta$ , corticosteróides ou pela ligação de recetores inibitórios (CD200R, CD172a), passando eles próprios a secretar IL10 e TGF $\beta$ . Estes macrófagos são também caracterizados por apresentar uma reduzida expressão de *MHC-II*, assim como uma diminuição tanto da explosão respiratória, como da produção de citocinas proinflamatórias [101, 105].



**Figura 5** - Heterogeneidade das funções dos macrófagos na inflamação. Os macrófagos apresentam capacidade para adquirir fenótipos distintos e atividades fisiológicas diversas, tendo em conta diferentes estímulos. Por exemplo, quando estimulados com interferão- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), os macrófagos mostram elevada atividade microbicida e produzem espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). Em contraste, quando estimulados com IL4 ou IL13, é gerado um fenótipo que promove a reparação dos tecidos, enquanto o contacto com a IL10 ou fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF $\beta$ , do inglês *Transforming Growth Factor beta*) está associado a um fenótipo que induz a supressão da inflamação. CD200R - recetor CD200; iNOS - óxido nítrico sintase induzível (do inglês *inducible nitric oxide synthase*); LPS - lipopolissacarídeo; LTA - ácido lipoteicoico (do inglês *Lipoteichoic Acid*); PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E<sub>2</sub>; PGN - peptidoglicano; TLR- Toll-like receptor; TNF - fator de necrose tumoral; adaptado de [101].

Em suma, tanto os estímulos da imunidade inata, como da adaptativa, podem influenciar a fisiologia dos macrófagos e essas alterações permitem que estas células participem não só na defesa do hospedeiro mas também em processos homeostáticos, como remodelação dos tecidos e cicatrização de feridas [102].



### c) Funções dos macrófagos

Os macrófagos ativados são mais eficientes que os não ativados na eliminação de potenciais patógenos. Esta propriedade deve-se às principais funções que estes efetuam, entre as quais se destaca: fagocitose, atividade citotóxica e antimicrobiana, apresentação antigénica, secreção de citocinas e quimiocinas [103].

- **Fagocitose** – Os macrófagos são capazes de ingerir e digerir antígenos exógenos, tais como microrganismos inteiros e partículas insolúveis e antígenos endógenos, tais como células lesadas ou mortas do hospedeiro e detritos celulares. Usando os recetores de superfície celular para identificar os alvos, os macrófagos envolvem o material indesejado, sequestrando-o num compartimento chamado fagossoma. Posteriormente, este compartimento funde-se com um compartimento lisossomal, que contém várias substâncias altamente tóxicas e reativas que facilitam a destruição do conteúdo do fagossoma [110].

- **Atividade citotóxica e antimicrobiana** – Os macrófagos ativados produzem várias substâncias citotóxicas e antimicrobianas que podem destruir os microrganismos fagocitados. Muitos destes mediadores são intermediários reativos de oxigénio e azoto com uma potente atividade antimicrobiana. A explosão respiratória, um processo enzimático que ocorre durante a fagocitose, é um dos principais mecanismos de morte pelos macrófagos ativados. Este processo depende da ativação da *NADPH* oxidase que utiliza o *NADPH* citosólico para reduzir o oxigénio extracelular a anião superóxido. O anião superóxido gerado é convertido em peróxido de hidrogénio pela superóxido dismutase que, por sua vez, poderá servir como precursor para a formação de radicais hidroxilo. Deste modo, o anião superóxido para além de ser um intermediário reativo de oxigénio bastante tóxico para os microrganismos fagocitados, gera ainda outros oxidantes poderosos/potentes, como o peróxido de hidrogénio e radicais hidroxilo [111]. Em adição, os macrófagos ativados por citocinas (por exemplo,  $\text{IFN}\gamma$ ), compostos microbianos (por exemplo, LPS) ou ambos expressam níveis elevados de óxido nítrico sintase induzível (*iNOS*, do inglês *inducible nitric oxide synthase*), uma enzima que oxida o aminoácido L-arginina para se obter óxido nítrico (*NO*, do inglês *nitric oxide*), uma espécie reativa de azoto com uma potente atividade microbiana [110, 112].

Para além dos radicais livres, os macrófagos ativados também sintetizam lisozima e várias enzimas hidrolíticas cujas atividades degradativas não necessitam de oxigénio. Em adição, produzem ainda um grupo de péptidos antimicrobianos e citotóxicos conhecidos por defensinas que podem matar várias bactérias [103].

- **Apresentação antigénica** – A fagocitose e subsequente destruição de material estranho pelos macrófagos, também, fornece uma forma de gerar sequências de péptidos antigénicos para apresentação aos linfócitos T via recetores *MHC-II* à superfície da célula. Esta interação levará à expansão de linfócitos T específicos para os antígenos e promoção da resposta imune adaptativa [113].

- **Produção de citocinas e quimiocinas** – Os macrófagos ativados, sobretudo pela via clássica, promovem a resposta inflamatória através da secreção das principais citocinas proinflamatórias, nomeadamente  $TNF\alpha$ , IL1 e IL6 [101, 103].

O  $TNF\alpha$  foi inicialmente identificado como um fator circulante que causava a necrose de tumores, daí a designação de Fator de Necrose Tumoral [114], mas atualmente é considerado uma citocina proinflamatória envolvida na imunidade inata, sendo um regulador chave da resposta inflamatória [115]. Os seus principais efeitos são a ativação das células endoteliais, ativação e migração de neutrófilos para o local de infeção, febre, síntese de proteínas de fase aguda no fígado [116, 117]. A exposição das células ao  $TNF\alpha$  pode resultar na ativação de uma cascata de caspases levando a apoptose das células [118]. No entanto, mais comumente, a ligação do  $TNF\alpha$  aos seus recetores leva à ativação de dois principais fatores de transcrição, *AP-1* e *NF- $\kappa$ B* que, por sua vez induzem os genes envolvidos na resposta inflamatória [119, 120] causando os efeitos acima mencionados.

A IL1 é um mediador da resposta inflamatória aguda e apresenta ações semelhantes ao  $TNF\alpha$ , uma vez que a ligação desta citocina aos seus recetores resulta também na ativação dos fatores de transcrição *AP-1* e *NF- $\kappa$ B*. Existem duas formas de IL1, denominadas IL1 $\alpha$  e IL1 $\beta$ , com menos de 30% de homologia entre elas, mas que se ligam aos mesmos recetores da superfície celular e apresentam as mesmas atividades biológicas. Ambas podem desencadear febre, uma vez que aumentam a síntese de prostaglandina E2 (PGE2) no endotélio vascular do hipotálamo, podendo também estimular a proliferação de células T. Além disso, a IL1 induz a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular [121].

A IL6 é uma citocina importante da resposta inflamatória aguda com efeitos locais e sistémicos, incluindo a indução da síntese de proteínas de fase aguda no fígado, tal como acontece com o  $TNF\alpha$ , bem como a estimulação da produção de neutrófilos na medula óssea. Além destes efeitos, a IL6 estimula a proliferação de linfócitos B e induz a sua maturação em células do plasma produtoras de anticorpos (plasmócitos) [121].

Para além da secreção de citocinas, os macrófagos ativados produzem também quimiocinas, um grupo de pequenos péptidos necessários para o recrutamento de células imunes (neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos) ao local de

infecção/inflamação e ao desenvolvimento de órgãos linfoides secundários. Duas das quimiocinas produzidas pelos macrófagos são a quimiocina (motivo C-C) ligando 2 (CCL2) também conhecida como proteína quimiotática de monócitos - 1 (*MCP-1*, do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) e a quimiocina (motivo C-C) ligando 3 (CCL3) também conhecida como proteína inflamatória de macrófagos - 1 $\alpha$  (*MIP-1 $\alpha$* , do inglês *Macrophage -Inflammatory Protein-1 alpha*) [122, 123].

A CCL2 é uma citocinas produzida por vários tipos de células, incluindo endoteliais, fibroblastos, epiteliais e monocíticas, tanto de uma forma constitutiva como induzida por citocinas ou *stress* oxidativo [124]. No entanto, considera-se que os monócitos/macrófagos são os principais produtores desta citocina. A CCL2 apresenta um papel chave na regulação da migração dos monócitos/macrófagos e linfócitos T de memória mas não de neutrófilos [124, 125].

A CCL3 é produzida pela maioria das células do sistema imune, incluindo os macrófagos, em resposta a vários estímulos proinflamatórios [126, 127]. Esta quimiocina está envolvida na resposta inflamatória aguda e crónica nos locais de infecção/inflamação essencialmente devido ao recrutamento de células proinflamatórias. Deste modo, é crucial para a quimiotaxia dos linfócitos T ao local de infeção bem como na migração dos monócitos. Os neutrófilos e eosinófilos são menos sensíveis aos efeitos quimiotáticos da CCL3 [127].

#### d) Macrófagos residentes

Conforme já referido, os macrófagos são células muito heterogéneas, sendo que essa heterogeneidade reflete-se na especialização da função adotada pelos macrófagos em diferentes localizações. Deste modo, poderá ser útil caracterizar as populações de macrófagos de acordo com a sua localização [105], destacando-se para este trabalho os macrófagos alveolares e as células de *Kupffer*.

### 1. Macrófagos alveolares

Os macrófagos alveolares são macrófagos residentes nos pulmões, importantes para a manutenção da homeostasia dos alvéolos pulmonares [128, 129] e que funcionam como a primeira linha de defesa contra qualquer material inalado incluindo poluentes ambientais e agentes infecciosos (vírus, bactérias, etc) [130]. Estas células apresentam não só capacidade de desencadear uma resposta inflamatória contra

patógenos, como também desencadeiam uma resposta anti-inflamatória para a proteção contra o dano excessivo [131].

Deste modo, o início da resposta inflamatória requer a combinação de eventos que se sobrepõem aos mecanismos inibidores que regulam os macrófagos alveolares. Uma vez iniciada a resposta inflamatória, o resultado da ativação dos macrófagos é determinado pelas propriedades específicas dos patógenos e pela resposta do hospedeiro a estes [132].

Geralmente, os macrófagos alveolares ativados têm uma maior capacidade fagocítica [133] e de explosão respiratória, bem como uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias [134], o que reforça a importância que os macrófagos alveolares na defesa do trato respiratório [132].

## 2. Células de *Kupffer*

As células de *Kupffer* são macrófagos residentes no fígado. Estas células encontradas nos sinusoides hepáticos constituem aproximadamente 35% das células hepáticas não parenquimatosas, representando 80-90% dos macrófagos residentes em tecido de todo o organismo [135]. Devido à sua abundância e localização, as células de *Kupffer* são componentes celulares cruciais do sistema imune inato intra-hepático, especializadas em desempenhar funções de captura e fagocitose, eliminando assim complexos proteicos, pequenas partículas e células apoptóticas da corrente sanguínea [136-138]. Juntamente com as células endoteliais sinusoidais constituem a primeira barreira à entrada de patógenos no fígado [139], o que é extremamente importante, uma vez que o sangue que flui na veia porta é rico em produtos derivados de patógenos, tais como LPS, e patógenos intestinais [140]. Para além da sua capacidade de *clearance* e captura de patógenos, as células de *Kupffer* são importantes células apresentadoras de antígenos, que expressam *MHC-I*, *MHC-II* e moléculas co-estimuladoras necessárias para a ativação das células T [141]. Em adição, estas células expressam e secretam citocinas e quimiocinas o que lhes permite funcionar como um vigilante do sistema imune, alertando os outros componentes do mesmo sistema para a presença de patógenos prejudiciais [135, 142].

## Objetivos

A informação publicada sobre a patogénese da DHC, onde se incluem publicações da equipa de investigadores pertencentes ao Departamento de Anatomia do ICBAS/UP e UMIB, levou este grupo a postular que a interação entre o VDHC e os sistemas imune inato e adaptativo de coelhos jovens e adultos apresentará diferenças significativas que podem culminar com um desfecho diferente da DHC. Estudos publicados no âmbito de outras febres hemorrágicas virais, como as induzidas pelos vírus Ébola e Marburgo, demonstram que os aspetos centrais da fisiopatologia e do quadro clínico são causados pelos efeitos da replicação viral nos macrófagos e nas células dendríticas, nomeadamente os macrófagos poderão suprimir a resposta imune do hospedeiro contra o vírus, contribuindo para a sua disseminação sistémica. É convicção deste grupo de investigação que mecanismos fisiopatológicos similares possam estar presentes nos animais adultos, suscetíveis à infeção por VDHC, mas ausentes nos coelhos jovens, resistentes à infeção. Assim, pretendeu-se com este trabalho contribuir para a clarificação do papel dos macrófagos na patogénese da DHC, nomeadamente avaliando a capacidade do vírus infetar este tipo celular, bem como, analisando os mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos de coelhos adultos infetados experimentalmente pelo VDHC. Em adição, pretendeu-se ainda contribuir para a clarificação da relação entre os macrófagos e os linfócitos T, nomeadamente CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no âmbito da DHC, particularmente avaliando a capacidade de os macrófagos ativarem linfócitos T, *in vitro*, bem como a capacidade de os linfócitos T produzirem citocinas que, por sua vez, estimulam a atividade microbici da dos macrófagos.

## Materiais e Métodos

Para o desenvolvimento de culturas primárias de macrófagos isolados de lavados broncoalveolares e de fígado de coelhos adultos controlo e infetados com VDHC foram testados no laboratório, várias vias e tempos de infeção, bem como vários protocolos de isolamento, sendo o que se encontra infracitado, o que apresentou melhores resultados.

### I. Coelhos

Para a realização deste trabalho foram adquiridos num biotério de produção (*Charles River Laboratories España, SA, Espanha*), 16 coelhos europeus (*Oryctolagus cuniculus*), de raça White New-Zealand, com 8 semanas de idade e livres de patógenos (*SPF, specific pathogen free*). Os animais foram mantidos em condições normais de alojamento com acesso ilimitado a água e comida. Todos os procedimentos foram executados de acordo com a Diretiva 2010/63/EU relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos.

### II. Infeção com o VDHC

O inóculo de VDHC usado neste trabalho foi obtido a partir de homogeneizados de fígado de coelhos adultos infetados que morreram espontaneamente com a DHC, como descrito por Teixeira et al. (2011) [143]. Dos 16 coelhos adquiridos, 10 foram utilizados no ensaio *in vitro* da cultura primária de macrófagos sendo que 5 foram infetados experimentalmente com o VDHC e 5 foram usados como grupo controlo. Os restantes 6 foram utilizados no ensaio *in vitro* de co-cultura de macrófagos com linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>, sendo que 3 foram infetados experimentalmente com o VDHC e 3 foram usados como grupo controlo. Deste modo, na totalidade dos dois ensaios, dos 16 coelhos adquiridos, 8 coelhos foram infetados experimentalmente com o VDHC e os restantes 8 constituíram o grupo controlo da infeção. Assim, 8 animais foram infetados, via intramuscular, com 100 µL de uma suspensão de VDHC (2<sup>12</sup> unidades hemaglutinantes, UHA) e foram eutanasiados 24 horas após a infeção. Os outros 8 que constituem o grupo controlo da infeção coelhos foram inoculados, via intramuscular, com 100 µL de PBS (o veículo do VDHC) e sacrificados 24 horas após a inoculação. Todos os animais foram eutanasiados com uma injeção intravenosa de tiopental sódico (100

mg/mL Tiopental 0,5g *Braun*<sup>®</sup>, *B.Braun*, Portugal) e após sedação com uma injeção intramuscular de uma mistura anestésica de xilazina (*Rompum*<sup>®</sup>, *Bayer Co.*, Portugal, 3 mg/kg) e quetamina (*Imalgéne 1000*<sup>®</sup>, *Merial*, Portugal, 10 mg/kg).

### III. Ensaio *in vitro* – Cultura primária de macrófagos

#### a) Colheita de amostras biológicas

Após o sacrifício dos animais foi realizada uma lavagem broncoalveolar, necessária ao isolamento de macrófagos alveolares. Para tal, procedeu-se à tricotomia da face ventral do pescoço e tórax dos coelhos e desinfeção da zona tricotomizada com uma solução de iodopovidona com álcool. Seguiu-se a incisão cutânea na linha média ventral do pescoço e o afastamento dos músculos *esternohioideus* que permitiu expor a traqueia. Esta foi submetida a uma pequena incisão ao nível dos primeiros anéis traqueais através da qual se introduziu uma cânula na direção caudal. A cânula foi fixada por um fio e nó cirúrgico. Após este procedimento acedeu-se à cavidade torácica, removendo-se a grelha esternocostal. Através da cânula traqueal, instilou-se nos pulmões 20 mL de *DPBS* (*Sigma-Aldrich*, *St. Louis, MO, USA*) / 3 mM *EDTA* (*Sigma*). Estes órgãos foram massajados com suavidade durante 30 segundos, o que permitiu incrementar o fluido da lavagem broncoalveolar recuperado, mediante aspiração com seringa acoplada à mesma cânula traqueal. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, mas com 15 mL de *DPBS* / 3 mM *EDTA*, perfazendo um volume total de 50 mL instilados. Este processo de instilação e recuperação permitiu maximizar a eficácia da lavagem broncoalveolar e recuperar, deste modo, um maior número de células. Logo após a recolha, os lavados broncoalveolares foram mantidos em gelo para posterior isolamento de macrófagos alveolares.

Seguidamente acedeu-se cirurgicamente à cavidade abdominal, para recolha asséptica do fígado dos coelhos. Este foi cortado em várias porções (num total de aproximadamente 7 g) que foram colocadas num falcon que já continha 30 mL de *DPBS* suplementado com 2% de soro fetal de bovino (*FBS*) (*Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) / 25 mM *HEPES* (*Sigma*) / 5 mM de *EDTA*. Após a colheita, estas amostras foram mantidas em gelo para posterior isolamento de macrófagos do fígado.

Foram ainda colhidas amostras de fígado para formol tamponado (*Panreac*<sup>®</sup>, Espanha).

## b) Isolamento de macrófagos alveolares

Os lavados broncoalveolares foram filtrados com um *cell strainer* de 100 µm (*BD Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). De seguida, perfez-se o volume até 40 mL com *DPBS* suplementado com 2% *FBS* / 25 mM *HEPES* / 5 mM *EDTA*, tendo a suspensão celular sido centrifugada a 300 g, 10 minutos a 4°C. Logo após, ressuspendeu-se o *pellet* com 30 mL da mesma solução e repetiu-se a centrifugação. Seguidamente, o *pellet* foi ressuspendido em 15 mL de *DPBS* suplementado. As células foram coradas com solução de *Türk* (*Merck Millipore, Alemanha*) e contadas em câmara de *Neubauer* (diluição 1:4). Após a contagem, centrifugou-se parte da suspensão celular a 300 g, 7 minutos a 4 °C e recuperaram-se as células em meio *RPMI* completo: *RPMI* 1640 (*Sigma*) suplementado com L-glutamina (4 mM; *Sigma*), penicilina/estreptomicina (100 IU/mL, 100 µg/mL, respetivamente; *Sigma*), gentamicina (100 µg/mL; *Sigma*), *HEPES* (25 mM) e 10% *FBS*, de modo a obter uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL.

## c) Isolamento de macrófagos do fígado

O isolamento dos macrófagos do fígado foi conseguido através de um procedimento que incluía uma centrifugação diferencial e adesão seletiva dos macrófagos.

As porções de fígado colhidas foram homogeneizadas num filtro de 100 µm, com auxílio do êmbolo de uma seringa. De seguida, filtrou-se o fígado homogeneizado com um *cell strainer* de 100 µm e perfez-se o volume até 50 mL com *DPBS* suplementado. A suspensão celular obtida foi dividida em duas alíquotas de 25 mL que foram transferidas para novos falcons; a cada, acrescentou-se solução de *DPBS* / 2% *FBS* / 25 mM *HEPES* / 5 mM *EDTA* até perfazer 50 mL. Seguidamente centrifugaram-se os homogeneizados de fígado a 300 g, 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspendido em 30 mL de *DPBS* / 2% *FBS* / 25 mM *HEPES* / 5 mM *EDTA*. Repetiu-se a centrifugação e ressuspendeu-se novamente o *pellet* em 25 mL de *DPBS* suplementado. De seguida, as suspensões celulares foram centrifugadas a 50 g, 3 minutos a 4°C. Esta centrifugação a baixa velocidade, permitiu a separação das células não-parenquimatosas, como é o caso dos macrófagos, das células parenquimatosas do fígado. Terminada a centrifugação, recolheu-se para um novo falcon os sobrenadantes, onde se encontravam os macrófagos, juntando-se, deste modo, as duas alíquotas separadas anteriormente. Seguidamente, as suspensões celulares foram centrifugadas a 300 g, 7 minutos a 4°C e o *pellet* foi ressuspendido em 20 mL de *DPBS* suplementado.



As células foram coradas com solução de *Türk* e contadas em câmara de *Neubauer* (diluição 1:4). Após a contagem, centrifugou-se a 300 g, 7 minutos a 4 °C e recuperaram-se as células em meio *RPMI* completo: *RPMI* 1640 suplementado com L-glutamina (4 mM), penicilina/ estreptomicina (100 IU/mL, 100 µg/mL, respetivamente), gentamicina (100 µg/mL), *HEPES* (25 mM) e 10% *FBS*, de modo a obter uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL.

#### d) Cultura primária de macrófagos

Os macrófagos obtidos a partir do fígado e dos lavados broncoalveolares foram colocados em cultura, tendo-se para tal adicionado 100 µL ( $1 \times 10^5$  células) de cada suspensão celular em poços de placas de 96 (*Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates, Thermo Scientific*). Estas foram colocadas na estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 2 horas, com o objetivo de permitir a adesão dos macrófagos à placa. Após este período, as placas foram retiradas da estufa, tendo-se definido três tempos de cultura: 2 horas, 6 horas e 26 horas.

Para as placas correspondentes ao tempo 2 horas, recolheu-se os sobrenadantes, os quais foram centrifugados a 1000 g, durante 20 minutos, a 4°C, e depois guardados a -80°C para posterior doseamento de citocinas e quimiocinas por *ELISA*. Os poços das mesmas placas foram lavados com *PBS* para remover as células não aderentes, tendo-se de seguida adicionado a cada poço 400 µL de *TRI Reagent®* (*Sigma*). As amostras foram guardadas a -80°C para posterior extração de *RNA* e avaliação da expressão de *mRNA* de citocinas e quimiocinas.

Para as placas correspondentes aos tempos 6 horas e 26 horas, procedeu-se à lavagem dos poços com *RPMI* aquecido, para remover as células não aderentes. De seguida, adicionou-se *RPMI* completo aos poços sem estímulo, e LPS (*Sigma*, 100 ng/mL no poço) e/ou VDHC purificado (rácio de infeção 10, 10 partículas virais por cada célula) aos poços com estímulo. As placas foram novamente colocadas na estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e foram retiradas ao fim de 6 ou 26 horas. Para cada tempo, centrifugou-se as placas a 216 g, 7 minutos a 4°C. Terminada a centrifugação, apenas os sobrenadantes das culturas de 26 horas foram recolhidos e guardados a -80°C para posterior doseamento de citocinas e quimiocinas por *ELISA*. Seguidamente, adicionou-se a cada poço das placas de cultura de 6 horas e 26 horas, 400 µL de *TRI Reagent®*. As amostras foram guardadas a -80°C para posterior extração de *RNA* e avaliação da expressão de *mRNA* de citocinas e quimiocinas.

### e) *Cytospins*

Foram realizados *cytospins* das suspensões celulares obtidas dos lavados broncoalveolares e do fígado. Deste modo, montaram-se os suportes de *cytospins*, colocando-se um funil e um filtro sobre a lâmina. De seguida, adicionou-se 50 µL de BSA 30% (*Sigma*) em PBS e  $1 \times 10^5$  células de cada amostra. Centrifugou-se 5 minutos a 1000 rpm na *cytocentrifuga* (*Cytospin 3, Shandon*), tendo-se deixado secar as lâminas à temperatura ambiente, pelo menos 30 minutos, e depois guardado a -20°C para posterior realização de imunofluorescência.

### f) Imunodeteção de antígenos de VDHC

Amostras de fígado de coelhos fixadas em formol tamponado foram utilizadas neste estudo para a deteção de antígenos específicos de VDHC por imunohistoquímica, sendo que para a revelação da ligação antígeno-anticorpo foi utilizado o método do complexo avidina-biotina (ABC, do inglês *Avidin-Biotin Complex*). Esta técnica permitiu não só detetar a dispersão do VDHC nos hepatócitos, células-alvo de replicação viral, como também analisar o grau de lesão do órgão, possibilitando assim avaliar a fase de evolução da doença induzida pela infeção experimental findas 24 horas.

As amostras foram desidratadas através de um gradiente de álcoois e xilol e incluídas em parafina. Foram depois efetuados cortes histológicos com 5 µm de espessura.

Os cortes foram, posteriormente, desparafinados e hidratados, do seguinte modo: as lâminas foram mergulhadas em xilol duas vezes, primeiro durante 10 minutos e depois durante 5 minutos. De seguida, foram mergulhadas numa série de álcoois, com gradientes decrescentes (100%, 95% e 70%), durante 5 minutos cada. Por último, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 10 minutos.

Efetuuou-se o bloqueio da peroxidase endógena, mergulhando as lâminas em peróxido de hidrogénio a 3% (*Merck*) em metanol (*Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough*, Reino Unido) durante 20 minutos. Após o bloqueio, estas foram lavadas 5 minutos com água desionizada e 2 x 5 minutos com PBS / Tween 0,05% (*Sigma*). Seguidamente incubaram-se as lâminas à temperatura ambiente, durante 20 minutos, em câmara húmida, com soro normal de coelho (*Dako*, Dinamarca) diluído 1:5 em BSA 10% em PBS, para bloquear ligações não específicas. Estas foram depois incubadas durante 2 horas, à temperatura ambiente, com um soro policlonal anti-VP60, produzido em rato, e diluído 1:1000 em BSA 5% / PBS / Tween 0,05%. Posteriormente lavaram-

se as lâminas 3 x 5 minutos em *PBS / Tween* 0,05%. Após as lavagens, estas foram incubadas à temperatura ambiente, durante 30 minutos, com um anticorpo secundário coelho anti-rato biotilado (*Dako*), diluído 1:200 em *BSA* 5% / *PBS / Tween* 0,05%. Concluída esta incubação, as lâminas foram lavadas 3 x 5 minutos em *PBS / Tween* 0,05%. De seguida, estas foram incubadas durante 30 minutos com o complexo avidina-biotina-peroxidase (*ABC*) (*VECTASTAIN® ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA*) (diluição: Reagente A e Reagente B - 1:50, em *BSA* 5% / *PBS / Tween* 0,05%). Terminada esta incubação, lavaram-se as lâminas 3 x 5 minutos em *PBS / Tween* 0,05%. Finalmente, as lâminas foram incubadas com o substrato, 3,3'-diaminobenzidina (*DAB*) (*Dako*) durante 45 segundos. Estas foram lavadas em água desionizada, 2 x 5 minutos e contrastadas com hematoxilina durante 15 segundos. Após o contraste, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 10 minutos. Por último, estas foram desidratadas mediante uma série crescente de álcoois (70%, 95% e 100%) durante 5 minutos cada e em seguida, imersas 2 x 5 minutos em xilol. Montaram-se as lâminas com *Entellan* (*Merck*) para uma posterior observação ao microscópio ótico.

### g) Marcação simples de macrófagos e dupla de VDHC e actina

Realizou-se a imunofluorescência dos *cytospins* de macrófagos alveolares e de fígado de coelhos controlo e infetados com VDHC para a marcação simples de macrófagos. Isto serviu para confirmar que as células presentes nas suspensões celulares, isoladas de lavados broncoalveolares e do fígado eram de facto macrófagos. Efetuou-se também imunofluorescência dos *cytospins* de macrófagos alveolares de coelhos controlo e infetados com VDHC para a marcação dupla de anti-VDHC / anti-actina, com o objetivo de detetar a presença de VDHC em macrófagos. A marcação com actina apesar de não ser específica para macrófagos permite evidenciar a morfologia das células.

Deste modo, as lâminas foram retiradas de -20°C e colocadas à temperatura ambiente, durante uma hora, para secar.

Fixaram-se e permeabilizaram-se as células com acetona a -20°C, durante 5 minutos e deixou-se secar ao ar durante 30 minutos. De seguida, as lâminas foram lavadas 5 minutos com *PBS / Tween* 0,05%.

Seguidamente incubaram-se as lâminas à temperatura ambiente, durante 30 minutos, em câmara húmida, com *BSA* 10% em *PBS*, para bloquear ligações não específicas. Estas foram depois incubadas 2 horas, à temperatura ambiente, com um

anticorpo monoclonal de rato anti-macrófagos de coelho (clone RAM 11, *Dako*), diluído 1:50 em *BSA* 0,01% / *PBS* / *Tween* 0,05% ou com um anticorpo monoclonal de rato anti-VDHC (*Bio-X Diagnostics*, Bélgica), diluído 1:20 em *BSA* 0,01% / *PBS* / *Tween* 0,05%. Posteriormente lavaram-se as lâminas 3 x 5 minutos em *PBS* / *Tween* 0,05%. Após as lavagens, as lâminas incubadas com o anticorpo primário, anti-macrófagos, foram incubadas à temperatura ambiente, durante 1 hora, com um anticorpo secundário Alexa Fluor 568 donkey anti-mouse IgG (*Invitrogen*, *Life Technologies*, *Thermo Fisher Scientific Inc.*), diluído 1:1000 em *BSA* 0,01% / *PBS* / *Tween* 0,05%. Simultaneamente, as lâminas incubadas com o anticorpo primário, anti-VDHC, foram incubadas durante 20 minutos com Faloidina / Alexa Fluor 488 (*Molecular Probes*, *Life Technologies*, *Thermo Fisher Scientific Inc.*), diluída em *PBS* / *Tween* 0,05% (5 µL de faloidina por cada 200 µL de *PBS* / *Tween* 0,05%). Concluídas as incubações, as lâminas foram lavadas 3 x 5 minutos em *PBS* / *Tween* 0,05%. Por fim, montaram-se as lâminas com *Vectashield Hard Set mounting medium for fluorescence with DAPI* (*Vector Laboratories, Inc*) e guardaram-se a 4°C, protegidas da luz, para uma posterior observação ao microscópio de fluorescência.

## h) Marcação dupla de VDHC e macrófagos

Posteriormente realizou-se a imunofluorescência dos *cytospins* de macrófagos alveolares e de fígado de coelhos controlo e infetados com VDHC para a marcação dupla, anti-VDHC e anti-macrófagos, para se comprovar que as células com apresentação de marcação positiva para o VDHC eram de facto macrófagos.

As lâminas foram retiradas de -20°C e colocadas à temperatura ambiente, durante uma hora, para secar.

Fixaram-se e permeabilizaram-se as células com acetona a -20°C, durante 5 minutos para os *cytospins* de lavados broncoalveolares e 10 minutos para os *cytospins* de fígado e deixou-se secar ao ar durante 30 minutos. De seguida, as lâminas foram lavadas 5 minutos com *PBS* / *Tween* 0,05%.

Efetuuou-se o bloqueio da autofluorescência, mergulhando as lâminas numa solução de borohidreto de sódio 1 mg/mL (*Sigma*) em *PBS*, durante 10 minutos. Após o bloqueio, estas foram lavadas 3 x 5 minutos com *PBS* / *Tween* 0,05%. Seguidamente incubaram-se as lâminas à temperatura ambiente, durante 30 minutos, em câmara húmida, com *BSA* 10% em *PBS*, para bloquear ligações não específicas. Estas foram depois incubadas 2 horas, à temperatura ambiente, com um anticorpo monoclonal de rato anti-macrófagos de coelho (clone RAM 11), diluído 1:50 em *BSA* 0,01% / *PBS* /

*Tween* 0,05%. Posteriormente lavaram-se as lâminas 3 x 5 minutos em *PBS* / *Tween* 0,05%. Após as lavagens, estas foram incubadas à temperatura ambiente, durante 1 hora, com um anticorpo secundário Alexa Fluor 568 *F(ab')<sub>2</sub>-goat anti-mouse IgG* (*Molecular Probes*), diluído 1:1000 em *BSA* 0,01% / *PBS* / *Tween* 0,05%. Concluída esta incubação, as lâminas foram lavadas 3 x 5 minutos em *PBS* / *Tween* 0,05%. De seguida, estas foram incubadas durante 1 hora com o segundo anticorpo primário, anticorpo monoclonal de rato anti-VDHC conjugado com *FITC* (*Bio-X Diagnostics*), diluído 1:20 em *BSA* 0,01% / *PBS* / *Tween* 0,05%. Terminada esta incubação, lavaram-se as lâminas 3 x 5 minutos em *PBS* / *Tween* 0,05%. Por fim, montaram-se as lâminas com *Vectashield Hard Set mounting medium for fluorescence with DAPI* e guardaram-se a 4°C, protegidas da luz, para uma posterior observação ao microscópio de fluorescência.

## i) Quantificação relativa de *mRNA* de citocinas e quimiocinas produzidas pelos macrófagos em cultura

### 1. Extração de *RNA*

O *RNA* total foi extraído de  $1 \times 10^5$  células (macrófagos em cultura) às 2, 6 e 26 horas de tempo de cultura, usando o *TRI Reagent*®.

As amostras, que haviam sido guardadas a -80°C, foram descongeladas em gelo. Após as amostras descongelarem, adicionou-se a cada amostra 1 µL de glicogénio (*Roche Diagnostics*) e vortexou-se. De seguida, adicionou-se 80 µL de clorofórmio (*Sigma*) a cada amostra, agitou-se no vórtex durante 15 segundos e incubou-se em gelo durante 15 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 18894 g, 15 minutos a 4°C. Terminada a centrifugação, recolheu-se a fase superior aquosa, onde se encontrava o *RNA*, para um novo *eppendorf DNase/RNase-free* que já continha 200 µL de isopropanol (*Sigma*) e vortexou-se. Para precipitar o *RNA*, incubaram-se as amostras a -20°C, *overnight*. Concluída esta incubação, as amostras foram novamente centrifugadas a 18894 g, 15 minutos a 4°C. Seguidamente descartou-se o sobrenadante, adicionou-se a cada amostra 400 µL de etanol a 70% (*Merck*) frio, ressuspendeu-se o pellet e repetiu-se a centrifugação. Para secar o pellet, após a centrifugação, descartou-se o etanol e deixou-se secar ao ar uns minutos. Por fim, dissolveu-se o pellet (*RNA*) em 9 µL água *DNase/RNase-free* (*Sigma*), à exceção das amostras usadas como controlo negativo da conversão de *RNA* (*Reverse transcriptase minus* (*RT*-) *negative control* e *No template control*) que foram dissolvidas em 16 µL de

água *DNase/RNase-free*. O RNA extraído foi doseado utilizando o aparelho *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*) e respetivo software.

## 2. Conversão de RNA

A síntese de *cDNA* foi efetuada usando *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (*Thermo Scientific*), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente preparou-se uma mistura reacional para todas as amostras, em que se adicionou *5X Reaction Mix* (2 µL / amostra) e *Maxima Enzyme Mix* (1 µL / amostra) e agitou-se suavemente. Após a mistura reacional estar preparada, adicionou-se 3 µL da mesma a novos tubos estéreis, *DNase/RNase-free*, um para cada amostra, aos quais se adicionou, seguidamente, 7 µL de RNA (1 pg – 2,5 µg) dissolvido em água *DNase/RNase-free*, perfazendo um volume total de 10 µL.

A conversão (25°C, 10 minutos; 50°C, 30 minutos; 85°C, 5 minutos) foi efetuada no *TProfessional Basic Thermocycler* (*Biometra GmbH, Alemanha*).

Para se verificar os resultados da síntese de *cDNA* efetuaram-se controlos negativos:

- *Reverse transcriptase minus (RT-) negative control*, um controlo importante que permite avaliar a contaminação com DNA genómico na amostra de RNA; este controlo continha todos os reagentes com exceção da *Maxima Enzyme Mix*.
- *No template control (NTC)*, um controlo importante para avaliar a contaminação dos reagentes; este controlo continha todos os reagentes com exceção do *template* de RNA.

## 3. PCR quantitativo em tempo real

Para uma quantificação relativa dos níveis de expressão de *mRNA* de Interleucina 1 beta (*IL1β*), Interleucina 6 (*IL6*), Interleucina 10 (*IL10*), Fator de Necrose Tumoral (*TNF*), quimiocina (motivo C-C) ligando 2 (*CCL2*) e quimiocina (motivo C-C) ligando 3 (*CCL3*) utilizou-se a técnica de *PCR* quantitativo em tempo real, com o kit *Kapa SYBR Fast qPCR* (*Kapa Biosystems Inc, Wilmington, MA, USA*) e o *Rotor Gene 6000* (*Corbett Life Science, Australia*).

Como genes constitutivos foram usados *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* (*HPRT1*) e *Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Beta Polypeptide 2-Like 1* (*GNB2L1*). O *HPRT1* é um gene constitutivo amplamente usado, não só em estudos

que avaliam a expressão de *mRNA* em macrófagos num contexto de infecção viral [144, 145], como também na análise da expressão de *mRNA* de citocinas em coelhos [146]. O *GNB2L1* é um gene constitutivo adequado para macrófagos, tendo sido identificado como um dos melhores genes constitutivos para macrófagos alveolares [147].

Os *primers* foram desenhados recorrendo ao *software Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e fornecidos pela *TIB Molbiol* (Berlim, Alemanha). As sequências dos *primers* (*Forward* e *Reverse*), o tamanho do amplicão e o *mRNA accession number* dos genes analisados podem ser encontrados na seguinte tabela.

<b>Gene</b>	<b>Primers (5' → 3')</b>		<b>Tamanho do amplicão (pb)</b>	<b>mRNA accession number</b>
<i>HPRT1</i>	<i>Forward</i>	GATACAGGCCAGACTTTGTTGG	196	NM_001105671.1
	<i>Reverse</i>	ACTGGCGATGTCAATGAGACT		
<i>GNB2L1</i>	<i>Forward</i>	GTGGGTATCTTGTGTCCGCTTC	93	XM_008262008.1
	<i>Reverse</i>	GCCAGATTCCATACCTTGACTAGC		
<i>IL1<math>\beta</math></i>	<i>Forward</i>	TTTGAAGAAGAACCCGTCTCTG	126	NM_001082201.1
	<i>Reverse</i>	ATACGTGCCAGACAACACCA		
<i>TNF</i>	<i>Forward</i>	GTCCCCAAACAACCTCCATCT	109	NM_001082263.1
	<i>Reverse</i>	CGGGTTTGCTACTACGTGGG		
<i>IL6</i>	<i>Forward</i>	ACTGGCGGAAGTCAATCTGC	82	NM_001082064.2
	<i>Reverse</i>	GCAGGTCTCATTATTCACCGC		
<i>IL10</i>	<i>Forward</i>	CTGCGACAATGTCACCGATTT	105	NM_001082045.1
	<i>Reverse</i>	GGCTTTGTAGACGCCTTCCT		
<i>CCL2</i>	<i>Forward</i>	CAGATGCCGTGAATCCCCA	136	NM_001082294.1
	<i>Reverse</i>	AGTTTGGTCATGAAGATCACAGCTT		
<i>CCL3</i>	<i>Forward</i>	GTACCCCGAGCACTCTTTGT	149	XM_002719246.2
	<i>Reverse</i>	TGTCGGCACCAAGTGGTATG		

**Tabela 2-** Sequências dos *primers* (*Forward* e *Reverse*), tamanho do amplicão e *mRNA accession number* dos genes usados como genes de referência e das citocinas e quimiocinas analisadas.

A reação foi realizada num volume final de 10  $\mu$ L, contendo 0,2  $\mu$ M de cada *primer* específico e 1x *Master Mix* juntamente com 1  $\mu$ L de *cDNA* obtido na conversão (diluído 1:2 em H<sub>2</sub>O *DNase* / *RNase-free*). O programa de amplificação foi o seguinte: 1) ativação da enzima a 95°C, 3 minutos; 2) amplificação em 35 ciclos (desnaturação: 95°C, 5 segundos; *Annealing* / Extensão: temperatura específica do *primer* (Tabela 3), 20 segundos).

Gene	Temperatura de <i>Annealing</i>
<i>HPRT1</i>	60°C
<i>GNB2L1</i>	62°C
<i>IL1<math>\beta</math></i>	60°C
<i>TNF</i>	62°C
<i>IL6</i>	62°C
<i>IL10</i>	60°C
<i>CCL2</i>	62°C
<i>CCL3</i>	62°C

**Tabela 3** - Temperatura de *Annealing* específica dos *primers* dos genes de referência e das citocinas e quimiocinas analisadas.

A análise dos resultados obtidos foi efetuada pelo método comparativo de  $C_t$ , em que os valores de expressão relativa dos genes foram calculados usando a seguinte fórmula:  $2^{-(C_t \text{ gene de interesse} - C_t \text{ gene constitutivo})}$  [148].

#### j) Doseamento de citocinas e quimiocinas produzidas pelos macrófagos em cultura por *ELISA*

Para quantificar os níveis de citocinas –  $TNF\alpha$ , IL1, IL6, IL10,  $IFN\alpha$  e CCL2 – presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos utilizou-se a técnica de *ELISA*.

As amostras (sobrenadantes) guardadas a -80°C foram descongeladas à temperatura ambiente. O doseamento de  $TNF\alpha$ , IL1, IL6, IL10,  $IFN\alpha$  e CCL2 foi efetuado de acordo com as instruções do fabricante (*Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA*) – kit de *ELISA sandwich*). Resumidamente foram adicionadas aos respetivos poços 100  $\mu$ L das amostras diluídas e das soluções padrão (fornecidas pelo kit), selou-se a placa e incubou-se durante 2 horas a 37°C. Seguidamente removeram-se as soluções de cada poço e adicionou-se 100  $\mu$ L de *Detection Reagent A* (anticorpo específico para  $TNF\alpha$ /IL1/IL6/IL10/ $IFN\alpha$ /CCL2 conjugado com biotina), a cada poço, durante 1 hora, a 37°C. Após a incubação, aspirou-se as soluções de cada poço e lavou-se 3 x 2 minutos a placa com *Wash Solution* (300  $\mu$ L por poço em cada lavagem). De seguida, removeu-se a solução de lavagem dos poços e adicionou-se 100  $\mu$ L de *Detection Reagent B* (avidina conjugada com *HRP*) a cada poço. Selou-se a placa e incubou-se durante 30 minutos a 37°C. Terminada a incubação, lavou-se novamente a placa, 5 x 2 minutos (300  $\mu$ L por poço em cada lavagem). Seguidamente adicionou-se 90  $\mu$ L de *Substrate Solution* (TMB) a cada poço, selou-se a placa e incubou-se a mesma, protegida da luz, durante 25 minutos para o  $TNF\alpha$ , 27 minutos para IL1, 29 minutos para  $IFN\alpha$  e 30 minutos para IL6, IL10 e CCL2, a 37°C. Por fim, adicionou-se a cada poço 50  $\mu$ L de *Stop*



*Solution* e leu-se a absorvância, a 450 nm (*Multiskan™ FC Microplate Photometer*, *Thermo Scientific*).

#### IV. Ensaio *in vitro* – Co-cultura de macrófagos alveolares com linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>

##### a) Colheita de amostras biológicas

Após o sacrifício dos animais foi realizada uma lavagem broncoalveolar, necessária ao isolamento de macrófagos alveolares, de acordo com o referido anteriormente no ponto (b) da secção III dos Materiais e Métodos.

Seguidamente acedeu-se cirurgicamente à cavidade abdominal, para recolha asséptica do baço dos coelhos inoculados com *PBS*. Estes foram colocados num falcon que já continha 20 mL de *DPBS* suplementado com 0,5% de *BSA* / 25 mM *HEPES* / 5 mM *EDTA*. Após a colheita, estas amostras foram mantidas em gelo para posterior isolamento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> do baço.

Foram ainda colhidas amostras de fígado para formol tamponado (*Panreac*®).

##### b) Isolamento de macrófagos alveolares

Os lavados broncoalveolares foram filtrados com um *cell strainer* de 100 µm. De seguida perfez-se o volume até 40 mL com *DPBS* suplementado com 0,5% de *BSA* / 25 mM *HEPES* / 5 mM *EDTA* e centrifugou-se a 280 g, 10 minutos a 4°C. Concluída a centrifugação, ressuspendeu-se o *pellet* em 2 mL de tampão de lise de eritrócitos (*Sigma*) e agitou-se durante 2 minutos. De seguida, o volume foi completo até 20 mL com *DPBS* suplementado com 0,5% de *BSA* / 25 mM *HEPES* / 5 mM *EDTA* e repetiu-se a centrifugação, para lavar as células. Seguidamente, o *pellet* foi ressuspendido em 15 mL de *DPBS* suplementado. As células foram coradas com solução de *Türk* e contadas em câmara de *Neubauer* (diluição 1:4). Após a contagem, centrifugaram-se os lavados broncoalveolares a 280 g, 10 minutos a 4°C e recuperaram-se as células em meio *RPMI* completo: *RPMI* 1640 suplementado com L-glutamina (4 mM), penicilina / estreptomicina (100 IU/mL, 100 µg/mL, respetivamente), gentamicina (100 µg/mL), *HEPES* (25 mM) e 10% *FBS*, de modo a obter uma concentração de 2x10<sup>6</sup> células/mL

### c) Isolamento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> com *beads* magnéticas

Os baços colhidos foram homogeneizados num filtro de 100 µm, com auxílio do êmbolo de uma seringa. De seguida, filtrou-se o baço homogeneizado com um *cell strainer* de 40 µm e centrifugou-se a 280 g, 10 minutos a 4°C, para lavar as células. Terminada a centrifugação, ressuspendeu-se o *pellet* em 5 mL de tampão de lise de eritrócitos, agitou-se durante 2 minutos, completou-se o volume até 30 mL com *DPBS* suplementado com 0,5% de *BSA* / 25 mM *HEPES* / 5 mM *EDTA* e repetiu-se a centrifugação. Seguidamente, o *pellet* foi ressuscitado em 20 mL de *DPBS* suplementado. As células foram coradas com solução de *Türk* e contadas em câmara de *Neubauer* (diluição 1:10). Após a contagem, para cada baço homogeneizado, recolheu-se 1x10<sup>8</sup> células para dois novos falcons, destinadas ao isolamento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Estas populações celulares foram isoladas com as *Anti-FITC MicroBeads* (*Miltenyi Biotec*, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. De uma forma resumida, começou por se passar as suspensões celulares por uma coluna LS (*Miltenyi Biotec*), para remoção dos macrófagos paramagnéticos e recolheu-se os respetivos eluatos. Após a recolha, as suspensões celulares (1x10<sup>8</sup> células) foram centrifugadas a 280 g, 10 minutos a 4°C. Terminada a centrifugação, ressuspendeu-se o *pellet* em 200 µL de *DPBS* suplementado com 0,5% de *BSA* / 25 mM *HEPES* / 5 mM *EDTA*. De seguida marcaram-se as células com os anticorpos anti - coelho CD4 conjugado com *FITC* (clone, KEN-4) ou anti - coelho CD8 conjugado com *FITC* (clone, 12.C7), ambos produzidos em rato (*AbD Serotec*): adicionou-se 8 µL do respetivo anticorpo às células ressuscitadas em 200 µL de tampão (diluição 1:25) e incubou-se durante 30 minutos, a 4°C, protegido da luz. Concluída a incubação, lavaram-se as células com 15 mL de *DPBS* suplementado e centrifugou-se a 300 g, durante 10 minutos. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, ressuscitaram-se as células em 900 µL de *DPBS* suplementado, adicionou-se 100 µL de *Anti-FITC MicroBeads* e incubou-se durante 20 minutos, a 4°C, protegido da luz. Após a incubação, as células foram novamente lavadas em 15 mL de *DPBS* suplementado, repetiu-se a centrifugação e ressuscitaram-se as células em 500 µL de *DPBS* suplementado. Seguidamente efetuou-se a separação magnética, utilizando-se para tal colunas LS. Começou por se equilibrar a coluna com 3 mL de *DPBS* suplementado e, de seguida, aplicou-se na coluna a suspensão celular com as células marcadas. Recolheram-se as células não marcadas (que não se ligaram à coluna) e lavou-se a mesma três vezes com 3 mL de *DPBS* suplementado. De seguida, adicionou-se 5 mL

de solução de *DPBS* suplementado e recolheu-se, para um novo falcon, a fração com as células marcadas magneticamente (linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>) com a ajuda do êmbolo fornecido com a coluna. As células recolhidas foram coradas com solução de *Türk* e contadas em câmara de *Neubauer* (diluição 1:2). Após a contagem, centrifugou-se a 280 g, 10 minutos a 4°C e recuperaram-se as células em meio *RPMI* completo: *RPMI* 1640 suplementado com L-glutamina (4 mM), penicilina/estreptomicina (100 IU/mL, 100 µg/mL, respetivamente), gentamicina (100 µg/mL), *HEPES* (25 mM) e 10% *FBS*, de modo a obter uma concentração de 2x10<sup>6</sup> células/mL.

O isolamento recorrendo ao uso de *beads* magnéticas permitiu obter suspensões celulares de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> com graus de pureza compreendidos entre 70-82% e 62-80%, respetivamente (este grau de pureza foi avaliado por citometria de fluxo).

#### d) Co-cultura de macrófagos alveolares com linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>

Os macrófagos dos lavados broncoalveolares de coelhos controlo e infetados com o VDHC foram colocados em cultura, tendo-se para tal adicionado 1x10<sup>5</sup> células / poço em placas de 96. As placas foram colocadas na estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 2 horas, com o objetivo de permitir a adesão dos macrófagos à placa, mas não de outro tipo de células. Após as 2 horas, as placas foram retiradas da estufa e submetidas à remoção das células não aderentes, por lavagem dos poços com meio *RPMI* aquecido. De seguida, adicionou-se 1x10<sup>5</sup> linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> nos poços de co-cultura onde previamente se tinha adicionado os macrófagos.

Alguns poços foram reservados para se colocarem apenas macrófagos sem estímulo (1x10<sup>5</sup> células / poço) ou macrófagos (1x10<sup>5</sup> células / poço) com estímulo, LPS (100 ng/mL no poço), bem como, apenas linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> sem estímulo (1x10<sup>5</sup> células / poço) ou linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> (1x10<sup>5</sup> células por poço) com estímulo, Concanavalina A (2,5 µg/mL no poço).

As placas foram novamente colocadas na estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Ao fim de 72 horas, as placas foram retiradas da estufa e centrifugadas a 216 g, 10 minutos, a 4°C. Após centrifugação, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e guardados a -80°C para posterior doseamento de citocinas e quimiocinas por *ELISA*. Seguidamente, a cada poço, adicionou-se 150 µL de *TRI Reagent*®, recolheu-se e guardou-se as amostras a -80°C para posterior extração de *RNA* e avaliação da expressão de *mRNA* de citocinas e quimiocinas.

### e) Imunodeteção de antígeno de VDHC

As amostras de fígado de coelhos fixadas em formol tamponado, foram utilizadas para a deteção de antígenos específicos de VDHC por imunohistoquímica, sendo que esta técnica permitiu não só detetar o VDHC nos hepatócitos, células-alvo de replicação viral, como também analisar o grau de lesão no órgão. O protocolo para a deteção do vírus por imunohistoquímica foi realizado de acordo com o referido anteriormente no ponto (f) da secção III dos Materiais e Métodos.

### f) Quantificação relativa de *mRNA* de citocinas e quimiocinas produzidas pelos macrófagos e linfócitos T em co-cultura

O protocolo para a quantificação relativa de *mRNA* de citocinas e quimiocinas produzidas pelos macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em co-cultura foi realizado de acordo com o referido anteriormente no ponto (i) da secção III dos Materiais e Métodos, com as seguintes alterações: o *RNA* total foi extraído de 2x10<sup>5</sup> células (macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> em co-cultura) às 72 horas de cultura, usando 150 µL de *TRI Reagent*<sup>®</sup>; para cada amostra adicionou-se 30 µL de clorofórmio e aquando a recolha da fase superior aquosa, onde se encontrava o *RNA*, para um novo *eppendorf DNase/RNase-free*, este já continha 75 µL de isopropanol.

### g) Doseamento de IFN $\gamma$ produzido pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em co-cultura com macrófagos por *ELISA*

Para quantificar os níveis de IFN $\gamma$  presentes no sobrenadante das co-culturas de macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> utilizou-se o kit de *ELISA* (*Cloud-Clone Corp*), de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo para o doseamento de IFN $\gamma$  foi efetuado de acordo com o referido anteriormente no ponto (j) da secção III dos Materiais e Métodos, com a seguinte alteração: incubou-se com a *Substrate Solution* (TMB), durante 30 minutos, a 37°C e protegido da luz.

## h) Doseamento de Nitritos pelo teste de *Greiss*

O teste de *Greiss* é amplamente usado para detetar nitritos (método indireto de deteção de óxido nítrico pelos macrófagos). O fundamento do método baseia-se na conversão do reagente de sulfanilamida num sal de diazónio, pelo nitrito presente. O sal de diazónio reage, por sua vez, com o reagente *NED* [*N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride] para formar um corante azo, com tonalidade púrpura / magenta (absorvância entre 520-550 nm). Nesta experiência utilizou-se este teste para dosear os nitritos presentes nos sobrenadantes do ensaio de co-cultura, macrófagos / T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>. Resumidamente adicionou-se 50 µL de cada sobrenadante ao respetivo poço de uma placa de 96, fundo plano. Preparou-se as diluições-padrão de NaNO<sub>2</sub> (concentrações finais, 125 – 1 µM) na placa de 96, 50 µL / poço. De seguida adicionou-se o reagente de *Greiss* [1º reagente: 50 µL de 1% (w/v) sulfanilamida (*Sigma*) em 2.5% ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, *Sigma*); 2º reagente: 50 µL de 0.1% (w/v) *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (*Sigma*) em 2.5% ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)]. Imediatamente após mediu-se a absorvância a 570 nm.

## V. Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi feita usando o *Mann-Whitney test*, calculando-se o nível de significância com o *software GraphPad Prism, version 6.07*. As diferenças foram consideradas significativas para \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 e \*\*\*\**p*<0.0001.

## Resultados

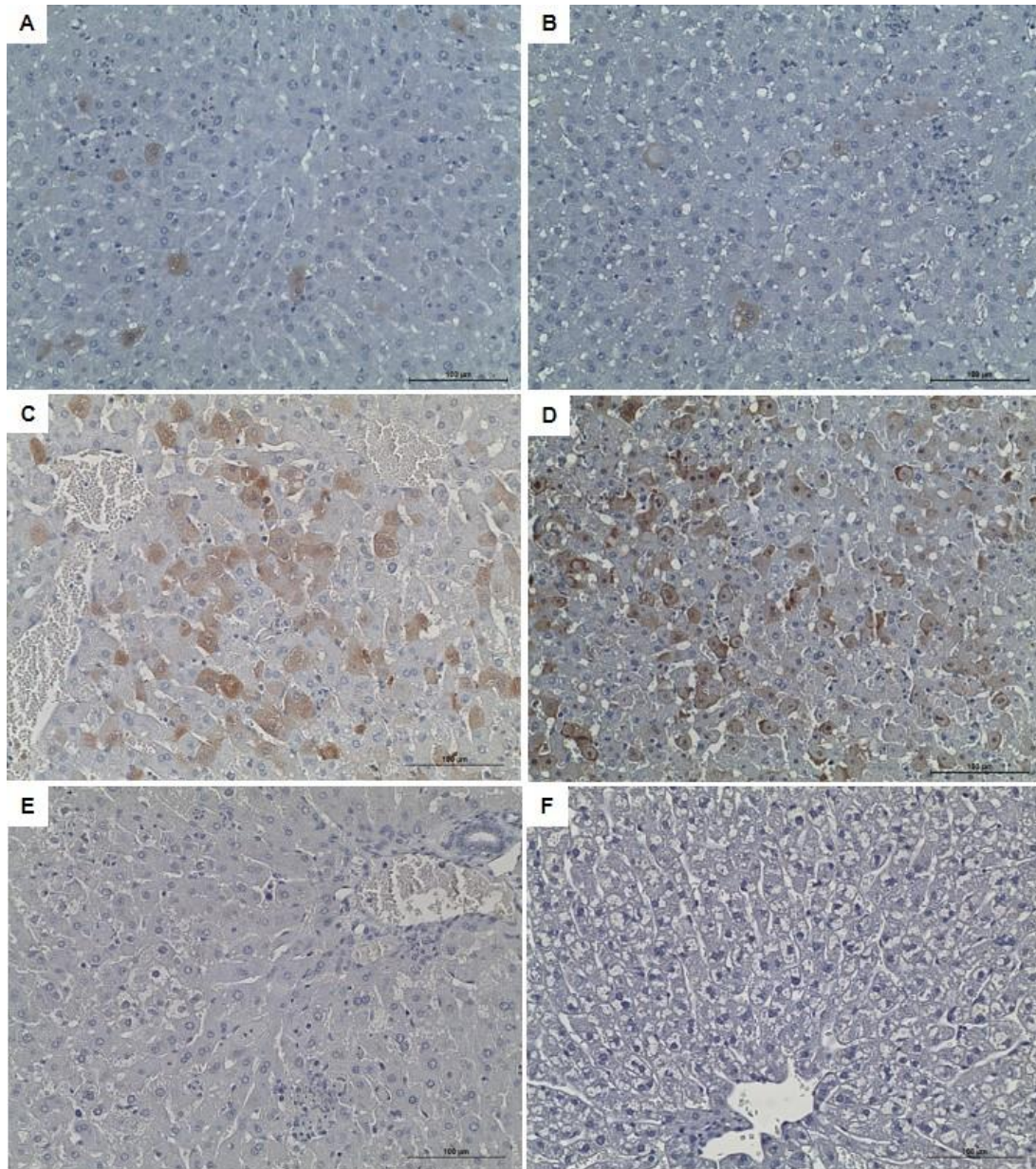
### I. Ensaio *in vitro* – Cultura primária de macrófagos

#### a) Imunodeteção de VDHC no fígado e quadro lesional

Para definir a fase de evolução da doença induzida pela infeção experimental às 24 horas de infeção, tempo ao qual os animais foram sacrificados, considerou-se importante fazer uma análise histopatológica do fígado de modo a caracterizar o grau de disseminação do vírus nos hepatócitos e o nível de lesão hepática. Assim, efetuou-se uma imunohistoquímica para detetar o VDHC nos hepatócitos, células-alvo de replicação viral.

Os resultados revelaram variabilidade na marcação do vírus nos hepatócitos, ou seja, em parte dos animais infetados a marcação para o vírus era apenas pontual, observando-se um baixo número de hepatócitos infetados (Figura 6A e 6B), enquanto noutros animais foi possível observar uma marcação generalizada do vírus nas células hepáticas, tanto nuclear como citoplasmática (Figura 6C e 6D). A maior dispersão do vírus no tecido hepático correlacionava-se positivamente com o grau de lesão hepática, isto é, com a presença de um maior número de hepatócitos lesionados. Estes exibiam citoplasmas vacuolizados e núcleos picnóticos ou com sinais de cariorréxis, sugerindo morte celular por apoptose. Estas lesões observaram-se quer em hepatócitos infetados, quer não infetados.

A evolução da DHC, neste caso induzida pela infeção experimental, é variável de animal para animal. Assim, para o mesmo tempo de infeção, neste caso 24 horas, os animais podem exibir uma fase inicial da doença ou uma fase mais avançada, próxima da morte por DHC (experiências passadas mostraram que a maior parte dos animais morre por volta das 24 horas da infeção mas alguns sobrevivem até tempos que rondam as 48 horas). Posto isto, a caracterização da fase da doença, traduzida na lesão hepatocitária, revelava-se uma exigência no trabalho de avaliação dos mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos de coelhos adultos infetados experimentalmente pelo VDHC, conforme se poderá atentar mais à frente neste trabalho.



**Figura 6 - Microscopia ótica de cortes histológicos de fígado – marcação para o VDHC (barra = 100 µm). (A a D)** Secções de fígado de coelhos adultos infetados; imunodeteção do vírus feita com soro de rato policlonal anti-VP60; **(E)** Secção de fígado de coelho adulto infetado; imunodeteção feita com soro de rato controlo; **(F)** Secção de fígado de coelho adulto controlo; imunodeteção feita com soro de rato policlonal anti-VP60. Os cortes foram revelados com DAB e contrastados com Hematoxilina. (Ampliação 200x)

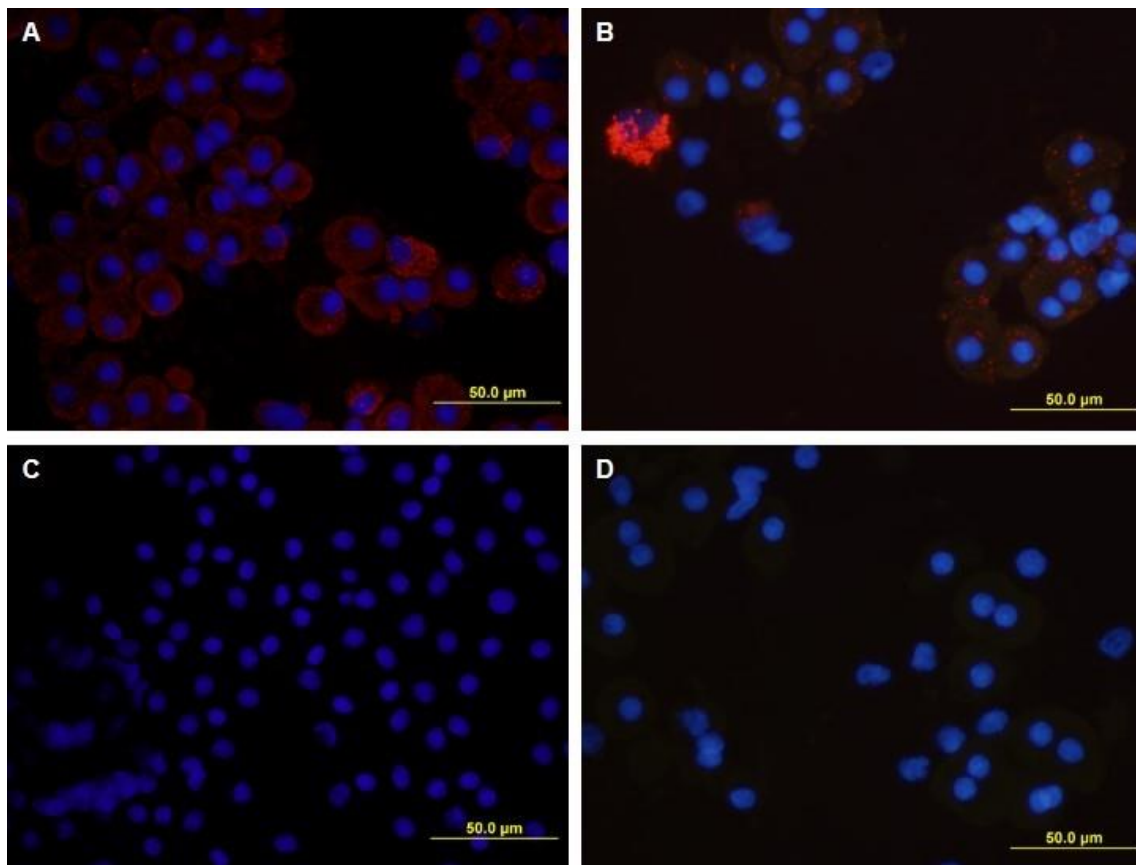
## b) Identificação de macrófagos nas suspensões broncoalveolares e de fígado

Conforme referido na introdução, os macrófagos são células que podem desempenhar um papel importante na resposta imunológica contra a infeção por VDHC, bem como, na disseminação do vírus.



Deste modo, o principal objetivo do presente trabalho, consistiu em conhecer o papel dos macrófagos na infeção pelo VDHC, pelo que parte desta dissertação assentou no desenvolvimento de culturas primárias de macrófagos isolados de lavados broncoalveolares e do fígado de coelhos adultos controlo e infetados com VDHC. Assim, várias vias (oral, intranasal e intratraqueal) e tempos de infeção (3 horas, 6 horas e 15 horas), bem como vários protocolos de isolamento foram testados no laboratório. No entanto, só o apresentado na secção material e métodos deste relatório apresentou um melhor rendimento no que concerne ao número de macrófagos *versus* contaminações por outras populações celulares.

Deste modo, fizeram-se *cytospins* das suspensões celulares dos lavados broncoalveolares e do fígado, tendo-se utilizado a técnica de imunofluorescência para identificação dos macrófagos, sendo que os resultados obtidos podem ser observados na Figura 7:



**Figura 7 - Microscopia de fluorescência dos *cytospins* – marcação para macrófagos (barra = 50 µm).** (A) *Cytospin* de suspensão celular de lavados broncoalveolares de um coelho adulto infetado com VDHC ( $2^{12}$  UHA) por via intramuscular e eutanasiado 24 horas após infeção; (B) *Cytospin* de suspensão celular de fígado de um coelho adulto infetado com VDHC ( $2^{12}$  UHA) por via intramuscular e eutanasiado 24 horas após infeção. Imunodeteção foi feita com um anticorpo monoclonal anti-macrófagos (RAM11) e o anticorpo secundário goat anti-mouse / Alexa Fluor 568 (Vermelho); (C) *Cytospin* de suspensão celular de lavados broncoalveolares de um coelho adulto infetado com VDHC ( $2^{12}$  UHA) por via intramuscular e eutanasiado 24 horas após infeção (controlo negativo da técnica); (D) *Cytospin* de suspensão celular de fígado de um coelho adulto infetado com VDHC ( $2^{12}$  UHA) por via intramuscular e eutanasiado 24 horas após infeção (controlo negativo da técnica). Incubação com o anticorpo secundário goat anti-mouse / Alexa Fluor 568. A cor azul corresponde à marcação dos núcleos com DAPI. (Ampliação 400x)

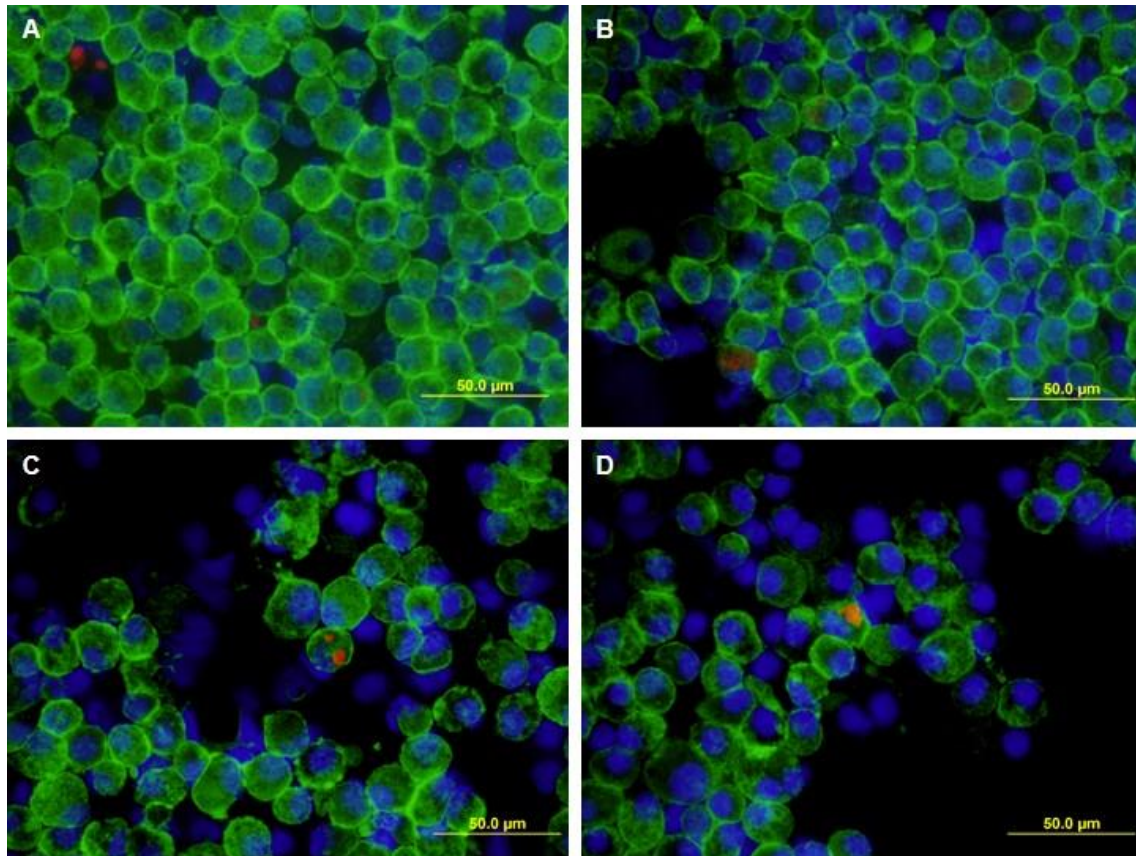


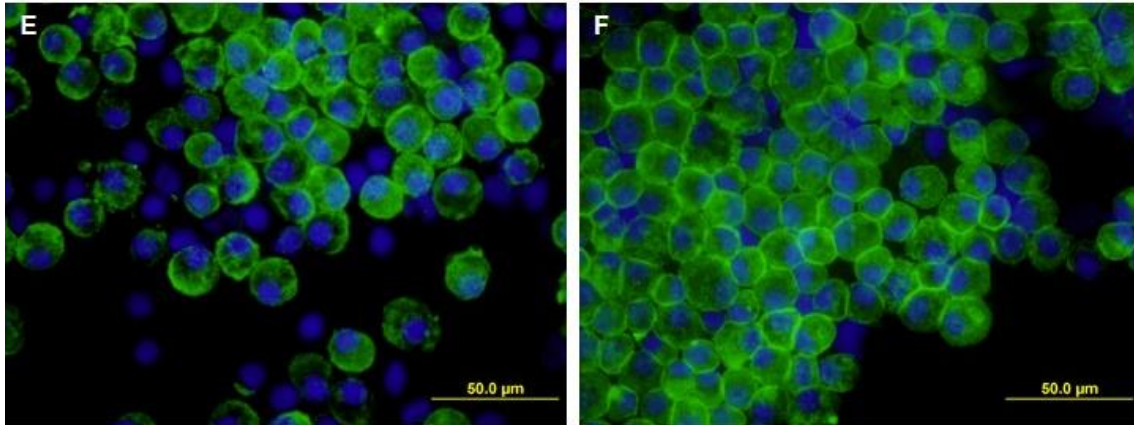
Pela análise das imagens, foi possível confirmar que as suspensões celulares, tanto dos lavados broncoalveolares, como do fígado, eram constituídas quase exclusivamente por macrófagos, uma vez que as células marcaram positivamente para o anticorpo monoclonal anti-macrófagos.

### c) Detecção do VDHC nos macrófagos

De forma a averiguar a capacidade do VDHC para infectar macrófagos, recorreu-se à técnica de imunofluorescência para a marcação dupla de VDHC e actina nos *cytopins* dos macrófagos dos lavados broncoalveolares de coelhos controlo e infectados com VDHC. A marcação com actina apesar de não ser específica para macrófagos permite evidenciar a morfologia das células.

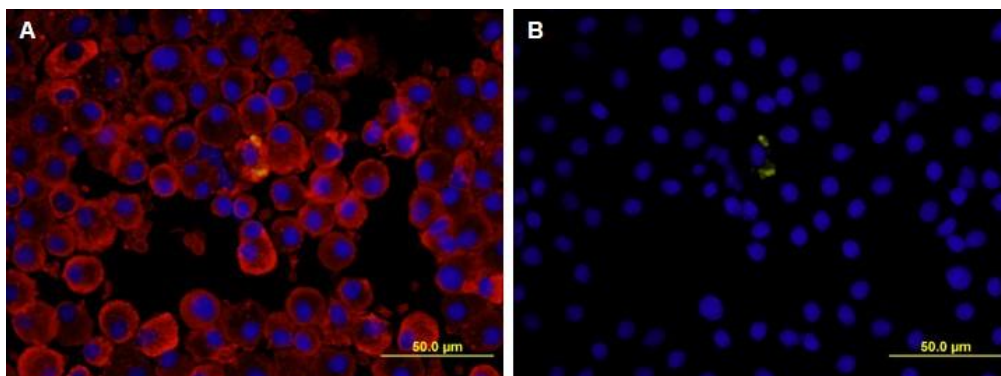
Foi possível detetar uma marcação amarela / alaranjada (por sobreposição do vermelho com o verde), isto é, antígenos de VDHC, no citoplasma de células marcadas positivamente para a actina (marca a estrutura) e pertencentes a lavados broncoalveolares (Figura 8).

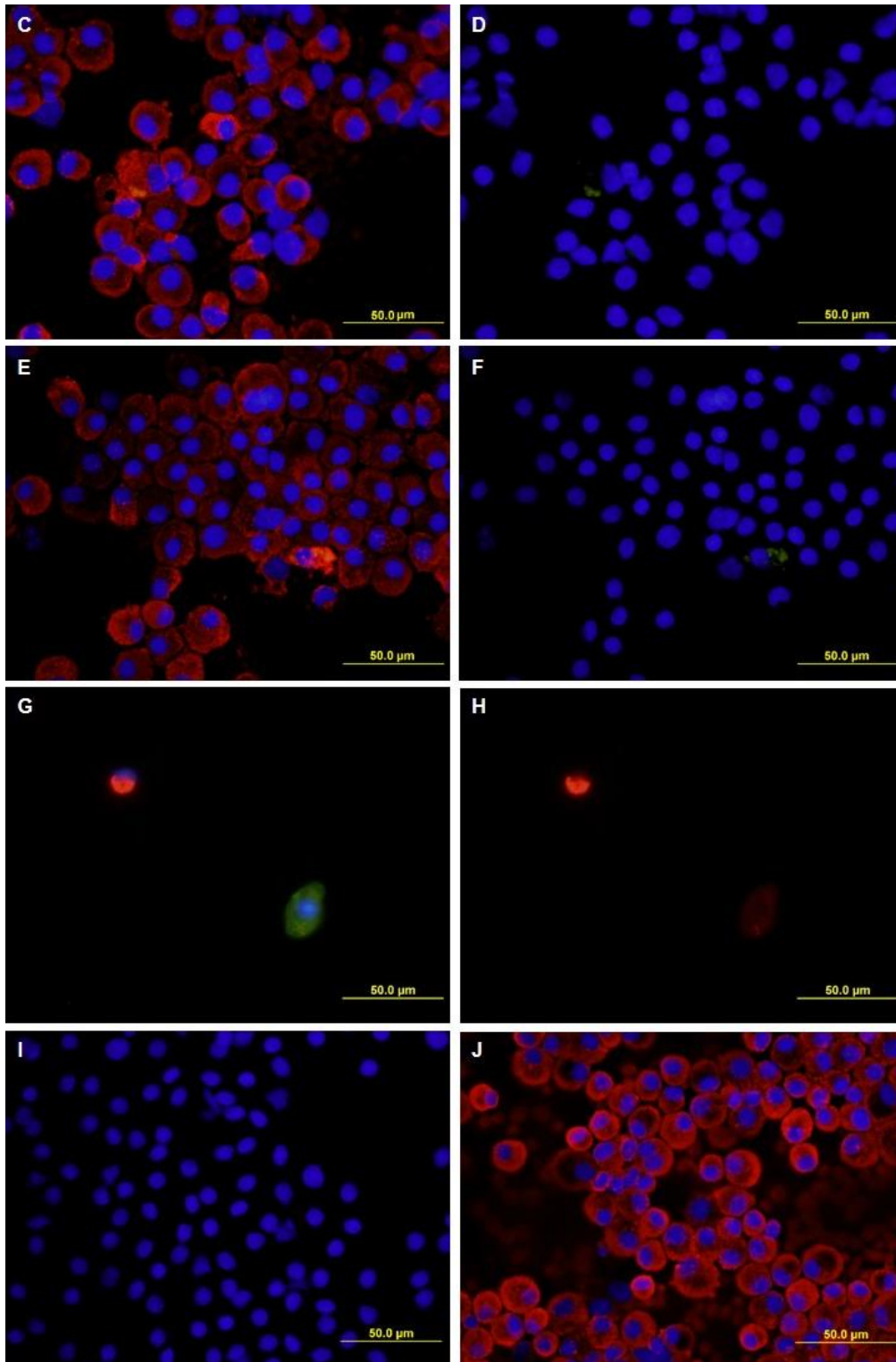




**Figura 8 - Microscopia de fluorescência dos cytopins – marcação para VDHC e actina (barra = 50 µm).** (A a D) *Cytopins* de suspensão celular dos lavados broncoalveolares de um coelho adulto infetado com VDHC ( $2^{12}$  UHA) por via intramuscular e eutanasiado 24 horas após infeção. Imunodeteção do vírus foi feita com um anticorpo monoclonal anti-VDHC e um anticorpo secundário goat ant-mouse / Alexa Fluor 568 (Vermelho); (E) *Cytopsin* de suspensão celular dos lavados broncoalveolares de um coelho adulto infetado com VDHC ( $2^{12}$  UHA) por via intramuscular e eutanasiado 24 horas após infeção (controlo negativo da técnica). Incubação com o anticorpo secundário goat anti-mouse / Alexa Fluor 568; (F) *Cytopsin* de suspensão celular dos lavados broncoalveolares de um coelho adulto controlo inoculado com PBS e eutanasiado 24 horas após inoculação (controlo negativo da experiência). Imunodeteção do vírus foi feita com um anticorpo monoclonal anti-VDHC e um anticorpo secundário goat ant-mouse / Alexa Fluor 568. A cor azul corresponde à marcação dos núcleos com DAPI e a cor verde corresponde à marcação da actina com faloidina / Alexa Fluor 488. (Ampliação 400x)

Apesar da morfologia das células, evidenciada pela marcação com actina, ser compatível com macrófagos, foi efetuada posteriormente uma imunofluorescência para a deteção simultânea de antígenos de VDHC e de macrófagos, sendo que as imagens obtidas podem ser observadas na Figura 9. As imagens revelaram a presença de células que marcaram positivamente, tanto para o VDHC, como para os macrófagos, o que permitiu confirmar a presença do VDHC em parte dos macrófagos às 24 horas após a infeção experimental com VDHC.



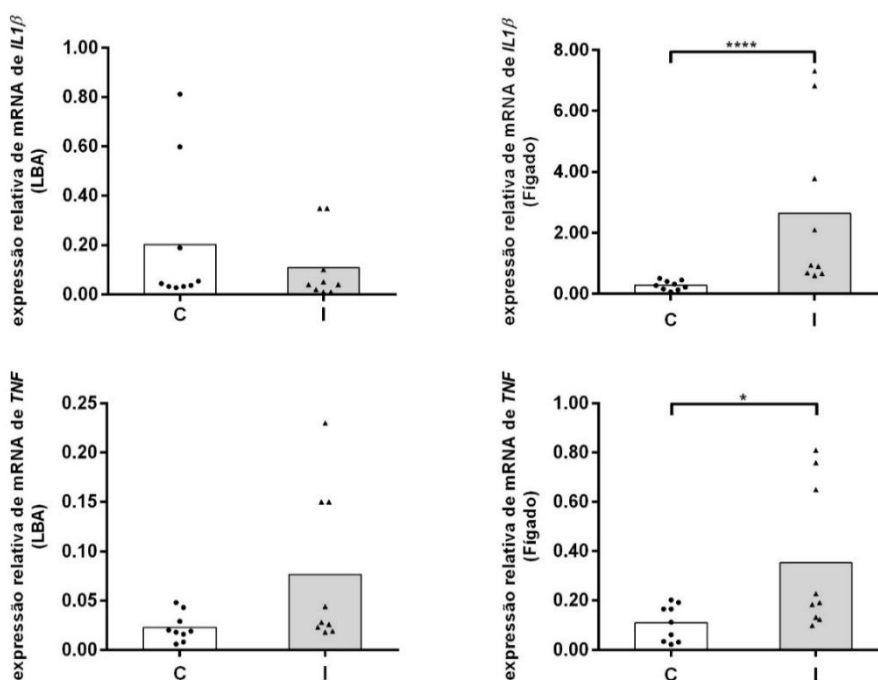


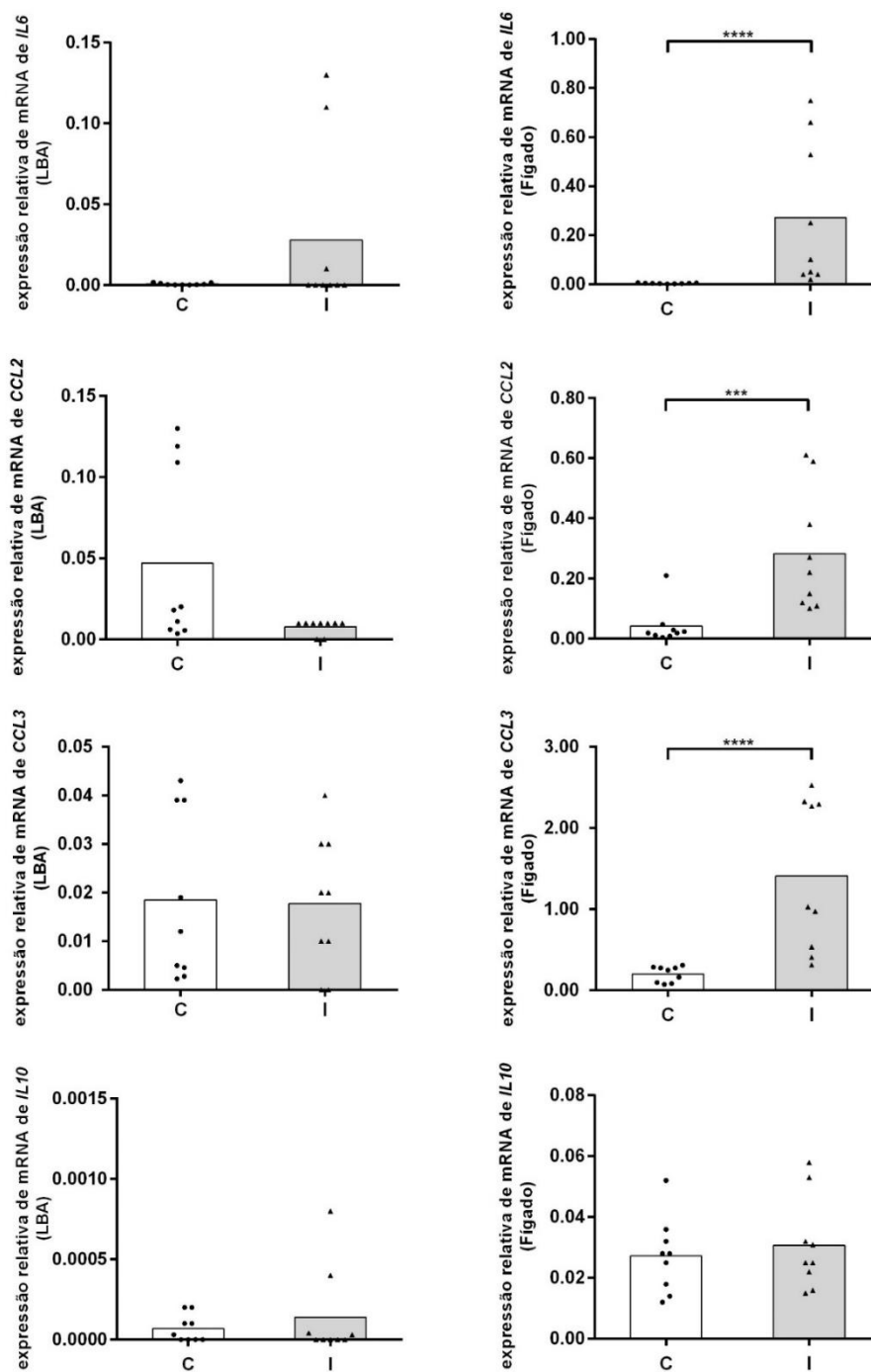
**Figura 9 - Microscopia de fluorescência dos cytopins – marcação para VDHC e macrófagos (barra = 50 µm).** (A a F) *Cytopins* de suspensão celular dos lavados broncoalveolares de um coelho adulto infetado com VDHC ( $2^{12}$  UHA) por via intramuscular e eutanasiado 24 horas após infeção (G e H) *Cytopins* de suspensão celular do fígado de um coelho adulto infetado com VDHC ( $2^{12}$  UHA) por via intramuscular e eutanasiado 24 horas após infeção. Imunodeteção do vírus foi feita com um anticorpo monoclonal anti-VDHC conjugado com FITC (Verde) e a imunodeteção de macrófagos foi feita com um anticorpo monoclonal anti-macrófagos (RAM11) e um secundário goat anti-mouse / Alexa Fluor 568 (Vermelho); (I) *Cytopin* de suspensão celular dos lavados broncoalveolares de um coelho adulto infetado com VDHC ( $2^{12}$  UHA) por via intramuscular e eutanasiado 24 horas após infeção (controlo negativo da técnica). Incubação com o anticorpo secundário goat anti-mouse / Alexa Fluor 568. (J) *Cytopin* da suspensão celular dos lavados broncoalveolares de um coelho adulto controlo inoculado com PBS e eutanasiado 24 horas após inoculação (controlo negativo da experiência). Imunodeteção do vírus foi feita com um anticorpo monoclonal anti-VDHC conjugado com FITC (Verde) e a imunodeteção de macrófagos foi feita com um anticorpo monoclonal anti-macrófagos (RAM11) e um secundário goat anti-mouse / Alexa Fluor 568. A cor azul corresponde à marcação dos núcleos com DAPI. (Ampliação 400x)

#### d) Quantificação da expressão relativa de *mRNA* de mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos em cultura

Para conhecer melhor o papel dos macrófagos na patogénese da DHC, nomeadamente na produção de mediadores inflamatórios, quantificaram-se os níveis relativos de *mRNA* dos genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias *TNF*, *IL1 $\beta$* , *IL6*, a citocina anti-inflamatória *IL10* e as quimiocinas *CCL2* e *CCL3*, expressos pelos macrófagos em cultura, isolados de animais controlo e infetados com VDHC, às 2, 6 e 26 horas de tempo de cultura.

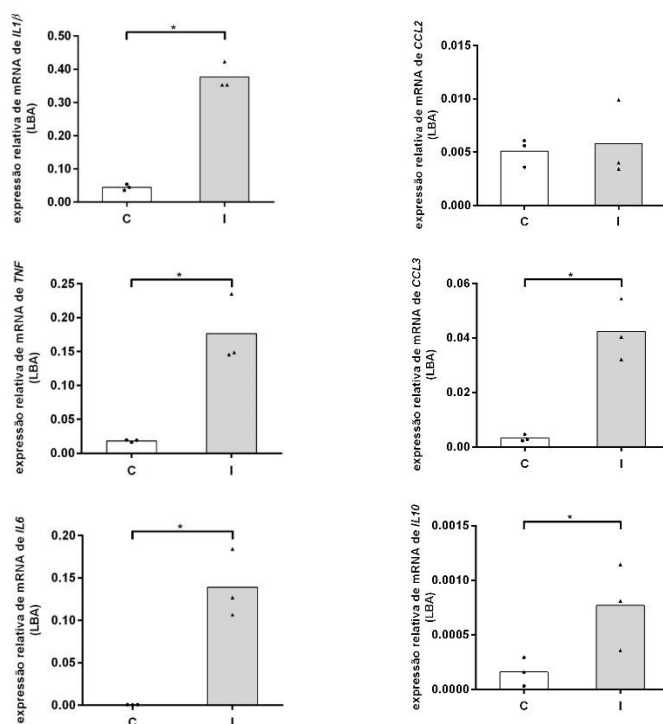
Os resultados obtidos para o tempo 2 horas de cultura apresentaram variabilidade que se mostrou positivamente correlacionada com a fase de evolução da doença. Assim, quando analisados os resultados obtidos a partir do conjunto dos animais infetados com VDHC, ou seja, daqueles que se encontravam num estado mais avançado e num estado mais inicial da infeção, apenas se registou um aumento significativo dos níveis de *mRNA* de *IL1 $\beta$* , *TNF*, *IL6*, *CCL2* e *CCL3* nos macrófagos do fígado dos coelhos infetados com VDHC em relação aos coelhos controlo (Figura 10). Todavia, quando se analisaram somente os dados recolhidos de animais num estado mais avançado da doença (traduzidos em maior disseminação viral e lesão hepática) pôde-se registar níveis de expressão significativamente mais elevados para os mediadores inflamatórios dos macrófagos isolados, não só no fígado, mas também nos macrófagos isolados dos lavados broncoalveolares (Figura 11).





**Figura 10 - Expressão relativa de mRNA dos mediadores inflamatórios (2 horas de cultura).** Estão representados os níveis de expressão relativa dos mediadores inflamatórios *IL1 $\beta$* , *TNF*, *IL6*, *CCL2*, *CCL3* e *IL10* dos macrófagos em cultura isolados dos lavados broncoalveolares (LBA) e do fígado de coelhos inoculados com *PBS* (C) (n=5, 2 replicas / animal) ou infectados com VDHC (I) (n=5, 2 replicas / animal). A normalização dos resultados foi feita utilizando os genes constitutivos, *GNB2L1* e *HPRT1*; *Mann-Whitney test*, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 e \*\*\*\*p< 0.0001.





**Figura 11 - Expressão relativa de *mRNA* dos mediadores inflamatórios (2 horas de cultura).** Estão representados os níveis de expressão relativa dos mediadores inflamatórios *IL1β*, *TNF*, *IL6*, *CCL2*, *CCL3* e *IL10* dos macrófagos em cultura isolados dos lavados broncoalveolares (LBA) de coelhos inoculados com *PBS* (C) (n=2, 2 réplicas / animal) ou infetados com VDHC (I) (n=2, 2 réplicas / animal). Os animais infetados encontravam-se num estado mais avançado de DHC. A normalização dos resultados foi feita utilizando os genes constitutivos, *GNB2L1* e *HPRT1*; *Mann-Whitney test*, \*p<0.05.

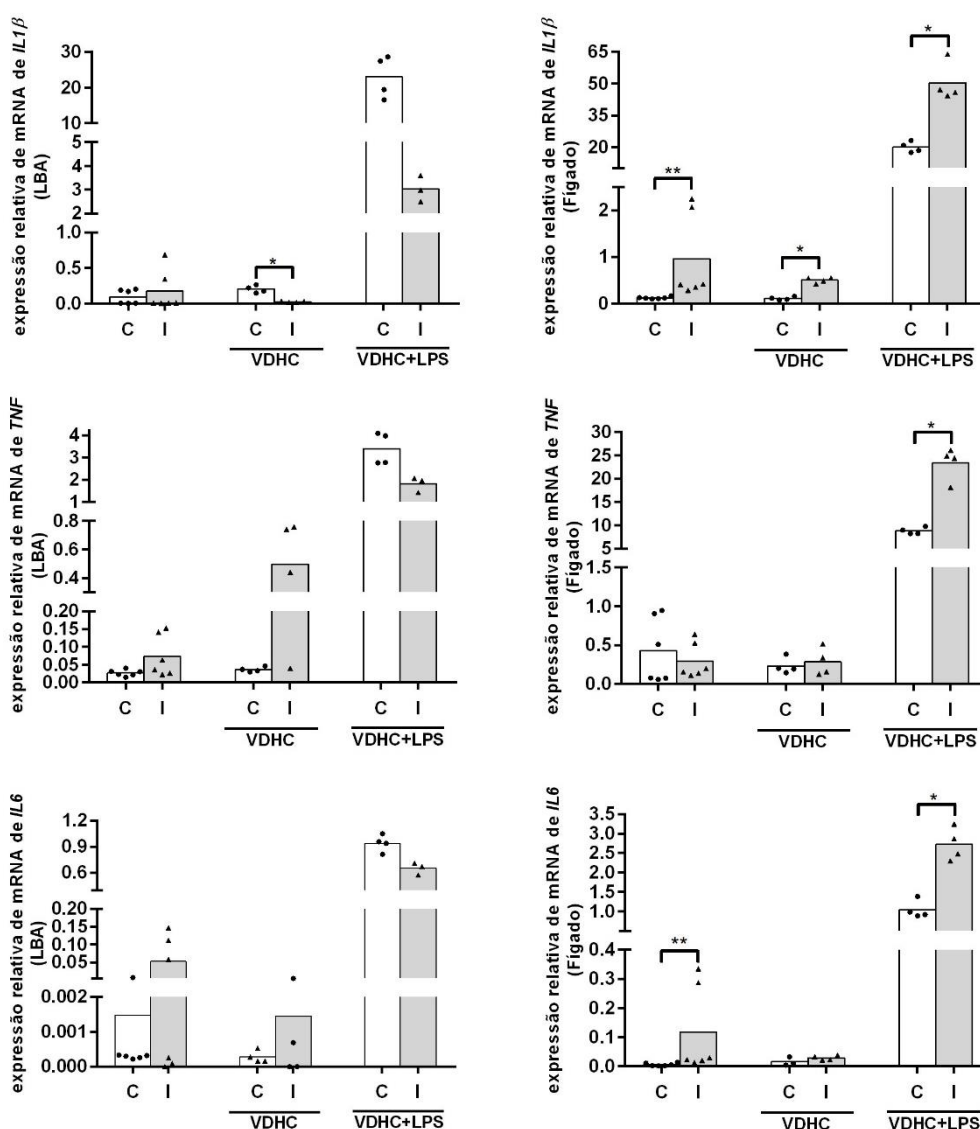
Os resultados obtidos para as 6 horas de cultura podem ser observados na Figura 12. Para os macrófagos alveolares que não foram estimulados, não se observaram alterações significativas nos níveis de expressão relativa de *mRNA* de citocinas e quimiocinas. Em contraste, nas culturas dos macrófagos do fígado registou-se um aumento significativo dos níveis de *mRNA* de *IL1β*, *IL6* e *CCL2* nos infetados comparativamente aos controlos. No que concerne às restantes citocinas avaliadas (*TNF*) e quimiocinas (*CCL3*) não se verificaram alterações significativas na expressão de *mRNA*, contrariamente ao que se observou para o tempo 2 horas de cultura.

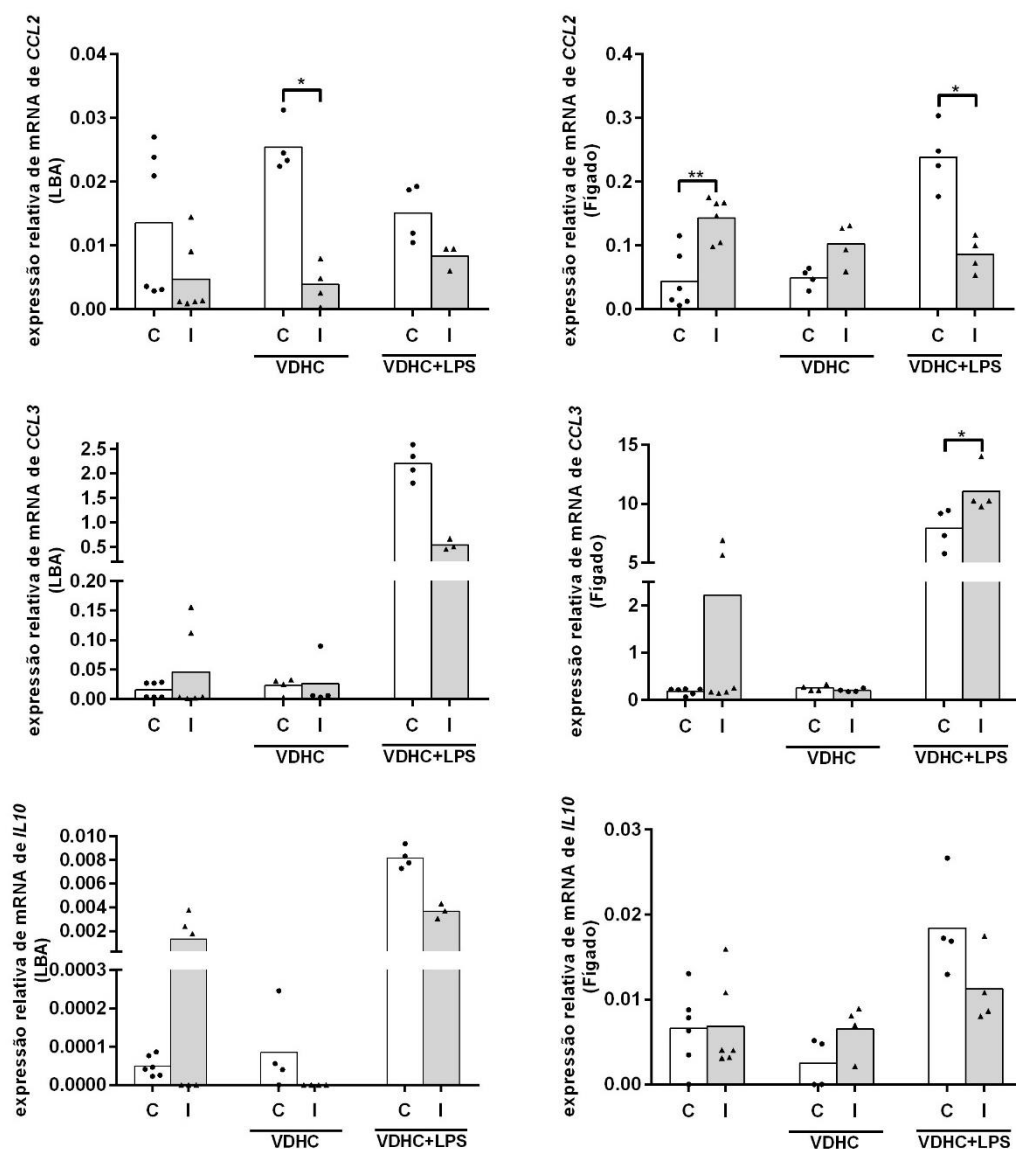
Após estimulação dos macrófagos em cultura (VDHC ou VDHC+LPS) verificou-se que as culturas de macrófagos alveolares continuaram a não mostrar aumentos significativos nas citocinas ou quimiocinas expressas, chegando mesmo a verificar-se níveis de *mRNA* de *IL1β* e *CCL2* significativamente inferiores nos coelhos infetados quando comparado com os controlos após estímulo com VDHC.

Nas culturas de macrófagos do fígado estimuladas com VDHC e LPS, observou-se um aumento significativo de *mRNA* de *IL1β*, *IL6*, *TNF* e *CCL3* nos coelhos infetados com VDHC quando comparado com os controlos. No entanto, ainda com este tratamento, a expressão de *mRNA* de *CCL2* foi significativamente inferior nos macrófagos do fígado de coelhos infetados com VDHC comparado com os controlos.

Em relação ao tratamento apenas com VDHC, registou-se apenas um aumento significativo dos níveis de *mRNA* de *IL1 $\beta$*  nos coelhos infetados com VDHC quando comparado com os controlos, não se detetando diferenças significativas para as restantes citocinas e quimiocinas.

Também não se observaram alterações significativas nos níveis de *mRNA* da citocina anti-inflamatória *IL10*, para ambas as condições das culturas de macrófagos (com e sem estimulação).

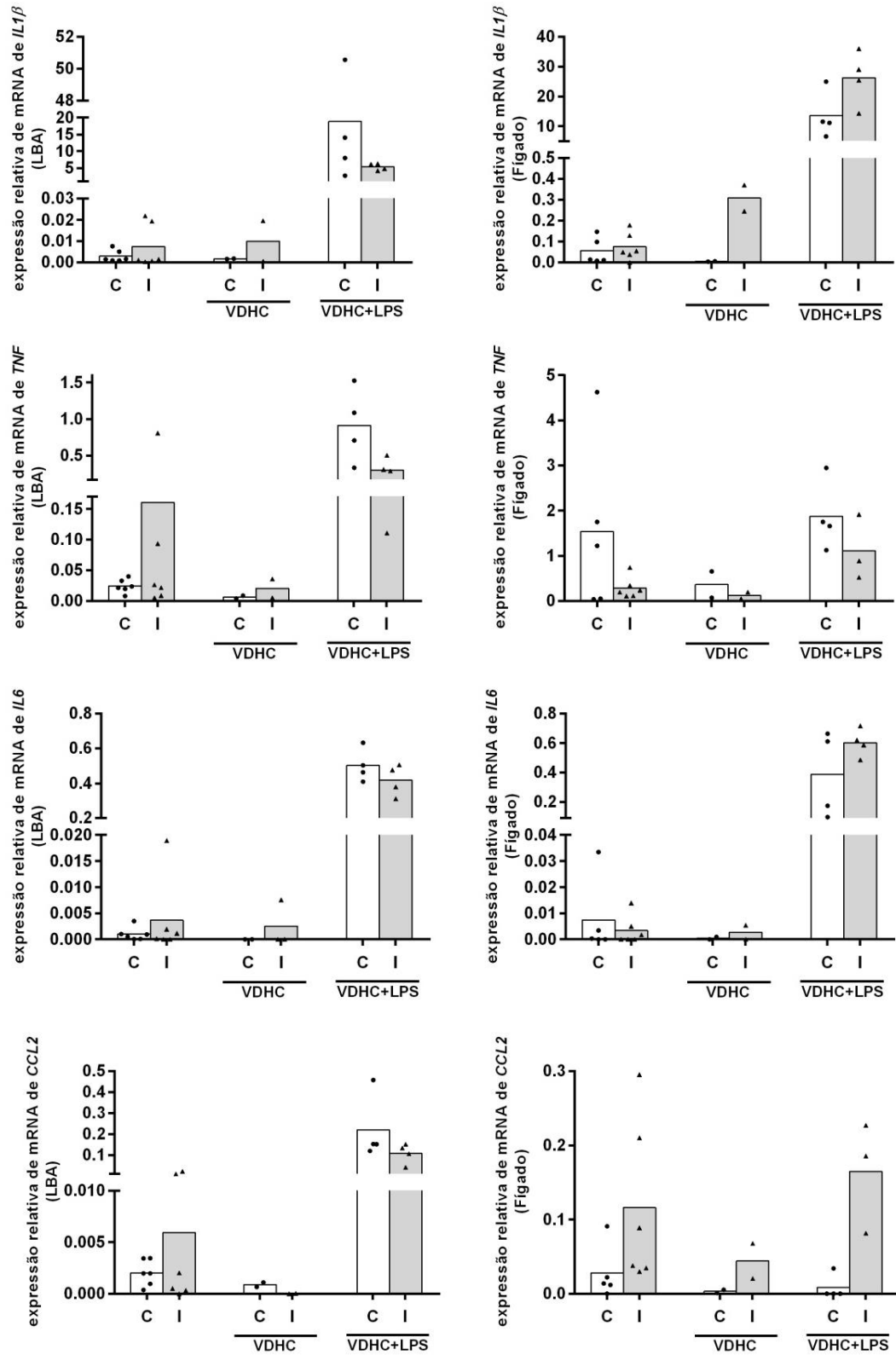


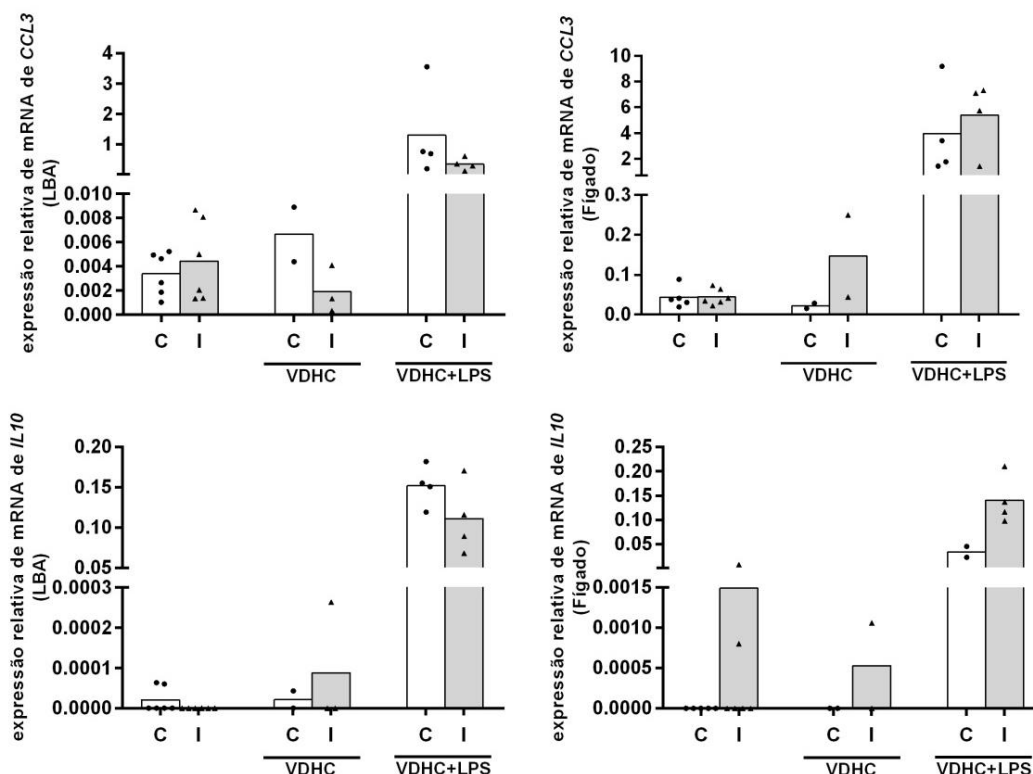


**Figura 12 - Expressão relativa de mRNA dos mediadores inflamatórios (6 horas de cultura).** Estão representados os níveis de expressão relativa dos mediadores inflamatórios (*IL1 $\beta$* , *TNF*, *IL6*, *CCL2*, *CCL3* e *IL10*) dos macrófagos em cultura isolados dos lavados broncoalveolares (LBA) e do fígado de coelhos inoculados com PBS (C) (n=3, 2 replicas / animal) ou infetados com VDHC (I) (n=3, 2 replicas / animal), sem estímulo e com estímulo (VDHC e VDHC+LPS). A normalização dos resultados foi feita com os genes constitutivos, *GNB2L1* e *HPRT1*; Mann-Whitney test, \*p<0.05 e \*\*p<0.01.

Os resultados obtidos para as 26 horas de cultura podem ser observados na Figura 13. Nesta é possível verificar-se que para as células que não foram estimuladas não se verificaram alterações significativas nos níveis de mRNA de citocinas e quimiocinas, tanto dos macrófagos alveolares como do fígado, entre os animais controlo e os infetados com VDHC. A mesma falta de significância foi registada nas culturas de macrófagos estimulados.







**Figura 13 - Expressão relativa de mRNA dos mediadores inflamatórios (26 horas de cultura).** Estão representados os níveis de expressão relativa dos mediadores inflamatórios (*IL1 $\beta$* , *TNF*, *IL6*, *CCL2*, *CCL3* e *IL10*) dos macrófagos em cultura isolados dos lavados broncoalveolares (LBA) e do fígado de coelhos inoculados com PBS (C) (n=3, 2 replicas / animal) ou infetados com VDHC (I) (n=3, 2 replicas / animal), sem estímulo e com estímulo (VDHC e VDHC+LPS). A normalização dos resultados foi feita utilizando os genes constitutivos, *GNB2L1* e *HPRT1*; Mann-Whitney test.

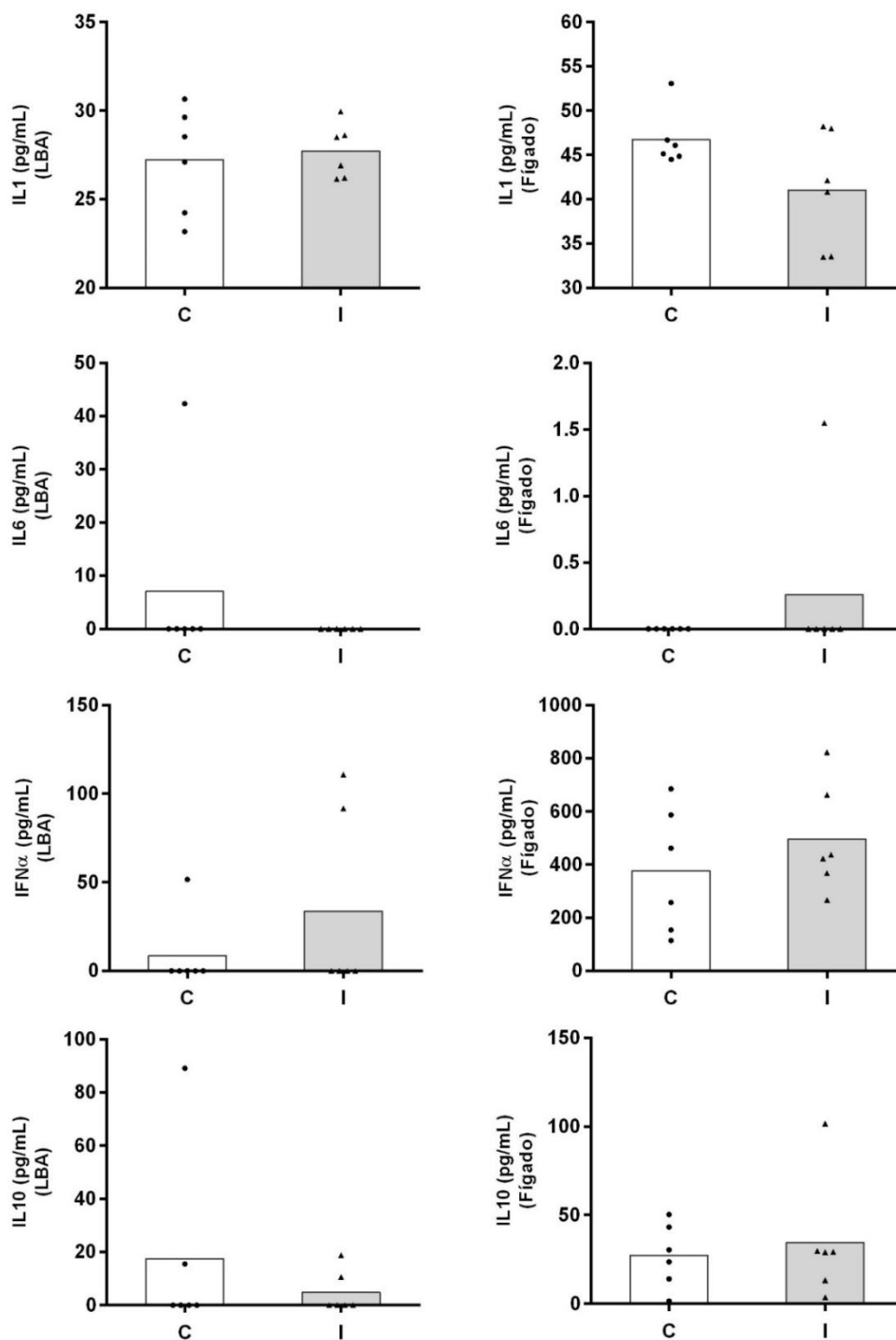
### e) Doseamento de mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos em cultura

Uma vez analisada a expressão relativa de mRNA de alguns dos mediadores inflamatórios expressos pelos macrófagos em cultura, procedeu-se ao doseamento, por ELISA, de alguns destes mediadores inflamatórios:  $TNF\alpha$ , IL1, IL6,  $IFN\alpha$ , IL10 e CCL2 nos sobrenadantes recolhido das culturas às 2 horas e IL1, IL6,  $IFN\alpha$  e IL10 às 26 horas.

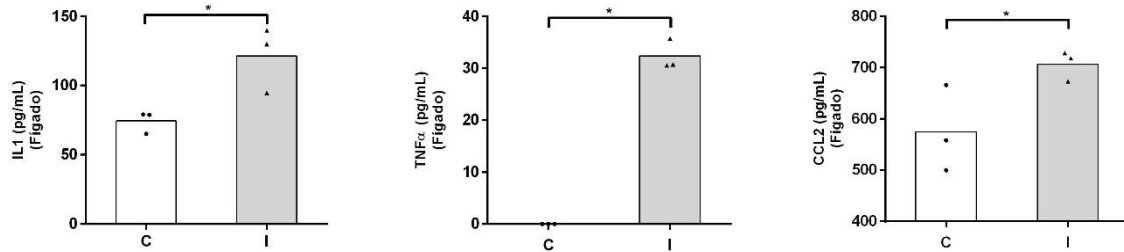
Os resultados obtidos às 2 horas de cultura apresentaram variabilidade que se mostrou dependente da fase de evolução da doença, à semelhança do documentado para a expressão relativa de mRNA dos mediadores inflamatórios.

Assim, quando analisados os resultados obtidos a partir do conjunto dos animais infetados com VDHC, não foi possível detetar diferenças significativas nos níveis de citocinas (IL1, IL6,  $IFN\alpha$  e IL10) avaliadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos dos lavados broncoalveolares e do fígado de animais infetados, quando comparados com os controlos (Figura 14). Contudo, quando se analisaram somente os dados recolhidos de animais num estado mais avançado da doença (traduzidos em

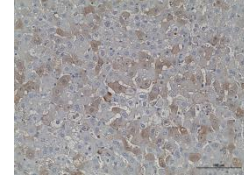
maior disseminação viral e lesão hepática) pôde-se registar níveis significativamente mais elevados de IL1, TNF $\alpha$  e CCL2 nos sobrenadantes dos macrófagos em cultura isolados do fígado dos coelhos adultos infetados com o VDHC (Figura 15).



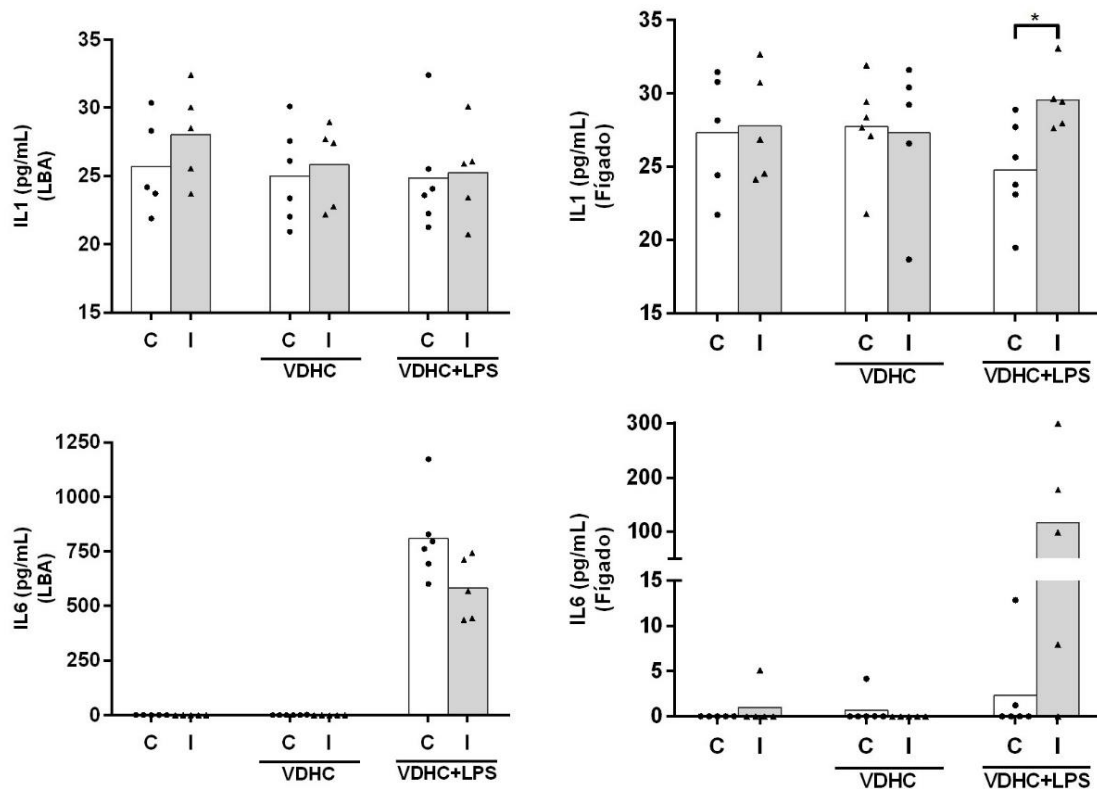
**Figura 14 - Doseamento dos mediadores inflamatórios – (2 horas de cultura).** Estão representadas as concentrações dos mediadores inflamatórios (IL1, IL6, IFN $\alpha$  e IL10) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos isolados dos lavados broncoalveolares (LBA) e do fígado de coelhos inoculados com PBS (C) (n=3, 2 réplicas por animal) ou infetados com VDHC (I) (n=3, 2 réplicas por animal); *Mann-Whitney test*.

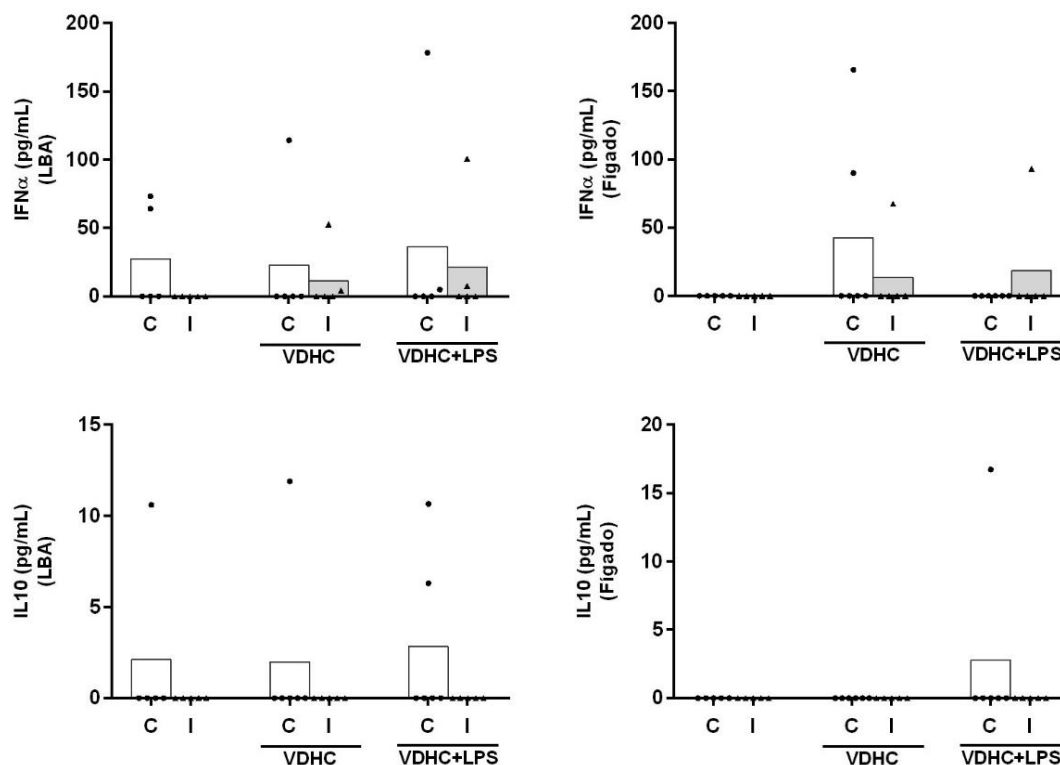


**Figura 15 - Doseamento das citocinas proinflamatórias (IL1 e TNF $\alpha$ ) e quimiocinas (CCL2) – (2 horas de cultura).** Estão representadas as concentrações das citocinas proinflamatórias (IL1 e TNF $\alpha$ ) e quimiocinas (CCL2) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos isolados do fígado de coelhos inoculados com PBS (C) (n=2, 2 réplicas por animal) ou infectados com VDHC (I) em fase mais avançada da DHC – histopatologia ao lado (n=2, 2 réplicas por animal); Mann-Whitney test, \*p<0.05.



Também para tempos mais avançados de cultura - 26 horas - os resultados obtidos no doseamento de citocinas e quimiocinas produzidos pelos macrófagos broncoalveolares e do fígado de coelhos controlo e infectados com o VDHC (Figura 16) não revelaram diferenças significativas entre os dois grupos de animais, salvo no que concerne aos níveis da citocina proinflamatória IL1 dos sobrenadantes da cultura de macrófagos do fígado, estimulados com VDHC e LPS.





**Figura 16 - Doseamento dos mediadores inflamatórios – (26 horas de cultura).** Estão representadas as concentrações dos mediadores inflamatórios (IL1, IL6, IFN $\alpha$  e IL10) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos isolados dos lavados broncoalveolares (LBA) e do fígado de coelhos inoculados com PBS (C) (n=3, 2 réplicas por animal) ou infectados com VDHC (I) (n=3, 2 réplicas por animal), sem estímulo e com estímulo (VDHC e VDHC+LPS); Mann-Whitney test, \*p<0.05.

## II. Ensaio *in vitro* – Co-cultura de macrófagos alveolares com linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>

Nesta parte do trabalho pretendeu-se avaliar dois aspetos: a ação dos linfócitos na resposta inflamatória e atividade microbiciada dos macrófagos, e a capacidade de os macrófagos ativarem linfócitos T, *in vitro*. Esta última foi avaliada pela produção de IFN $\gamma$  e a primeira pela expressão de mediadores inflamatórios, mais concretamente, as citocinas proinflamatórias *TNF*, *IL1 $\beta$*  e *IL6*, uma citocina anti-inflamatória *IL10* e as quimiocinas *CCL2* e *CCL3*, bem como, pela produção de óxido nítrico

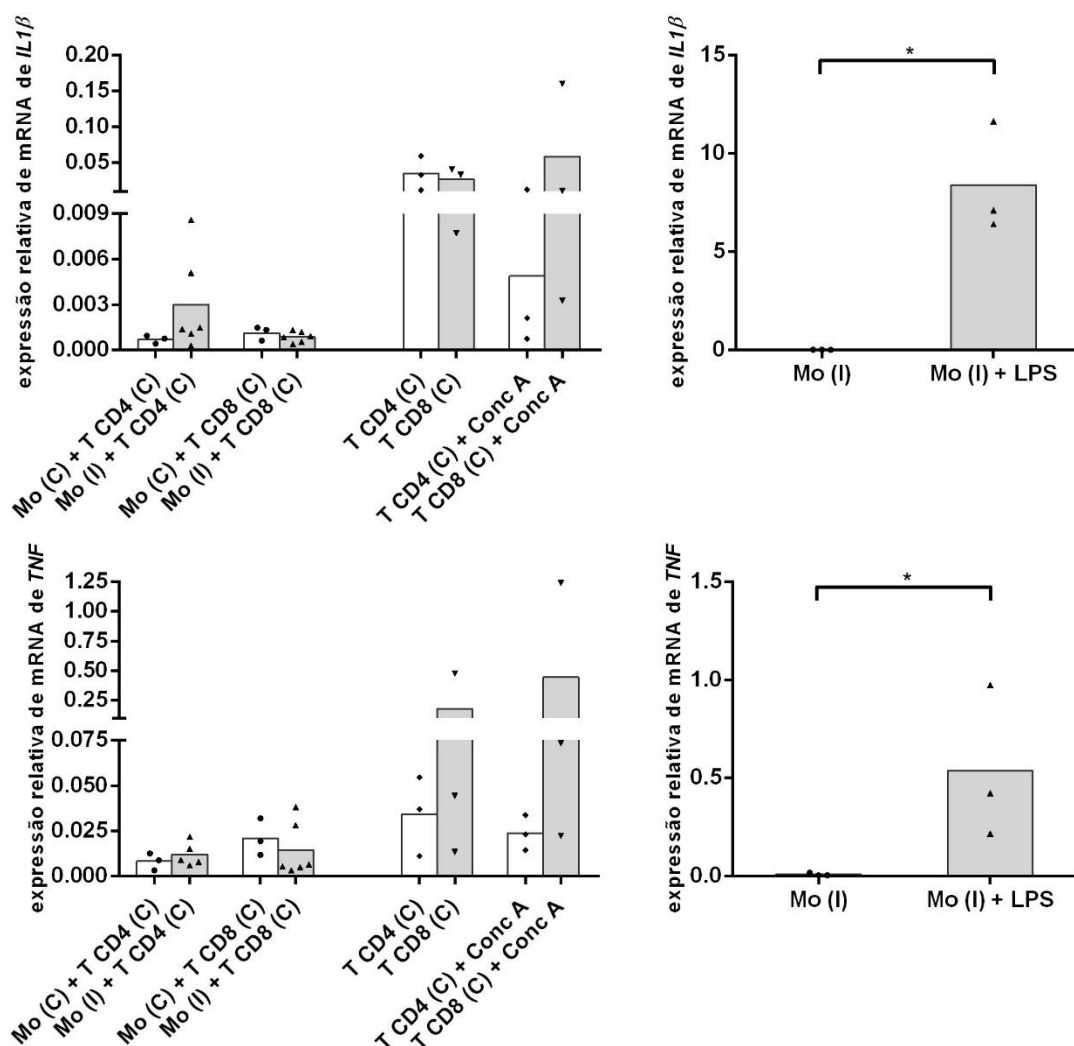
### a) Imunodeteção de VDHC no fígado e quadro lesional

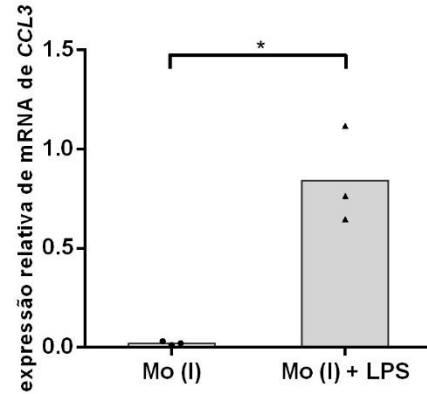
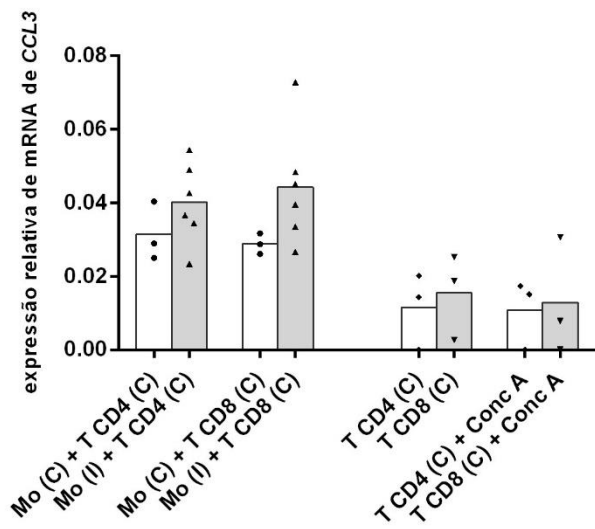
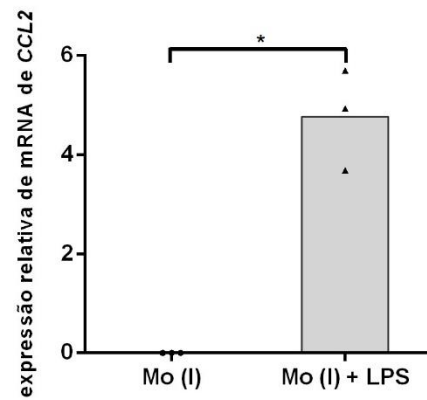
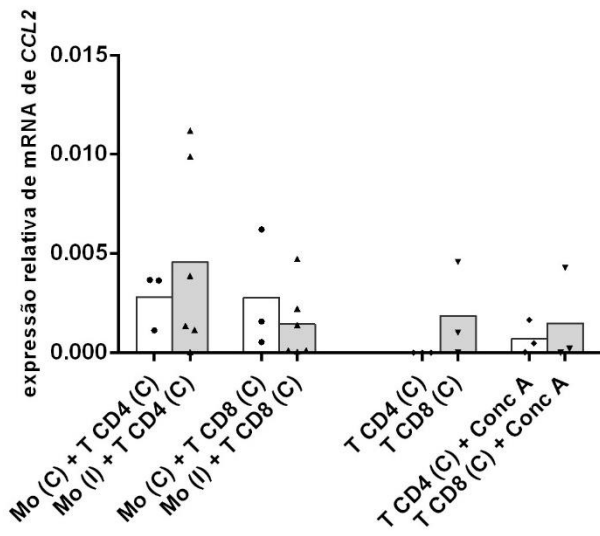
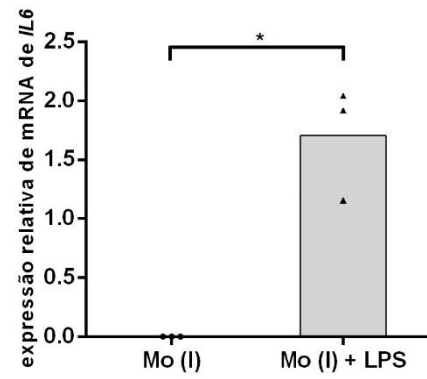
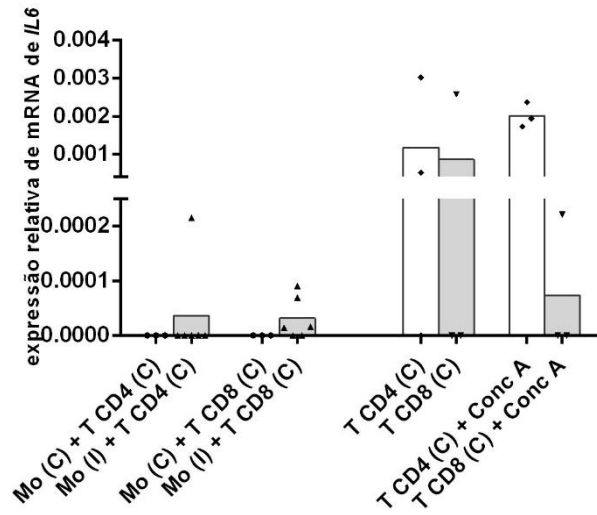
Tal como efetuado no ensaio *in vitro* da cultura primária de macrófagos, também neste ensaio *in vitro* de co-cultura considerou-se pertinente efetuar uma análise histopatológica dos fígados dos coelhos usados. Os resultados obtidos permitiram observar uma marcação generalizada do vírus nos hepatócitos, tanto nuclear como

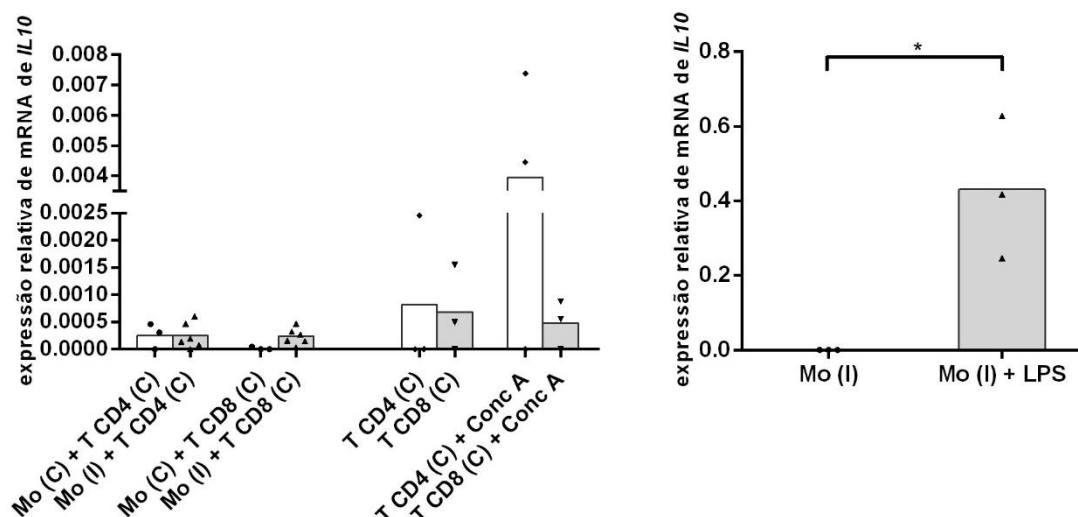
citoplasmática, para dois animais, e uma marcação mais esporádica para o terceiro animal infectado.

## b) Quantificação relativa de *mRNA* de mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos e linfócitos T em co-cultura

De acordo os resultados (Figura 17) não há diferenças significativas nos níveis de *TNF*, *IL1 $\beta$* , *IL6*, *CCL2*, *CCL3* e *IL10* expressos pelas células em co-cultura, macrófagos isolados de coelhos infectados (I) com linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> controlo (C) comparativamente com os macrófagos isolados de coelhos controlo (C) com linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> controlo (C). Os resultados mostram ainda que os macrófagos cultivados eram viáveis, já que após 72 horas de estímulo com LPS (estímulo policlonal) apresentaram um aumento significativo de todas as citocinas analisadas (*IL1 $\beta$* , *TNF*, *IL6*, *IL10*, *CCL2* e *CCL3*).







**Figura 17 - Expressão relativa de mRNA dos mediadores inflamatórios (72 horas de co-cultura).** Estão representados (lado esquerdo) os níveis de *IL1 $\beta$* , *TNF*, *IL6*, *CCL2*, *CCL3* e *IL10* expressos pelas células em co-cultura: macrófagos isolados de coelhos adultos controlo [Mo(C)] ou infetados [Mo(I)] com linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> isolados de coelhos adultos controlo [T CD4(C) / T CD8(C)] (n=3, 2 réplicas / animal), bem como, pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> isolados de coelhos adultos controlo sem estímulo [T CD4(C) / T CD8(C)] e com estímulo, Concanavalina A [T CD4(C) / T CD8(C) + Conc A]. Estão ainda representados (lado direito) os níveis de *IL1 $\beta$* , *TNF*, *IL6*, *CCL2*, *CCL3* e *IL10* expressos pelos macrófagos isolados de coelhos adultos infetados sem estímulo [Mo(I)] ou estimulados com LPS [Mo(I)+LPS]. A normalização dos resultados foi feita com os genes constitutivos, *GNB2L1* e *HPRT1*; *Mann-Whitney test*.

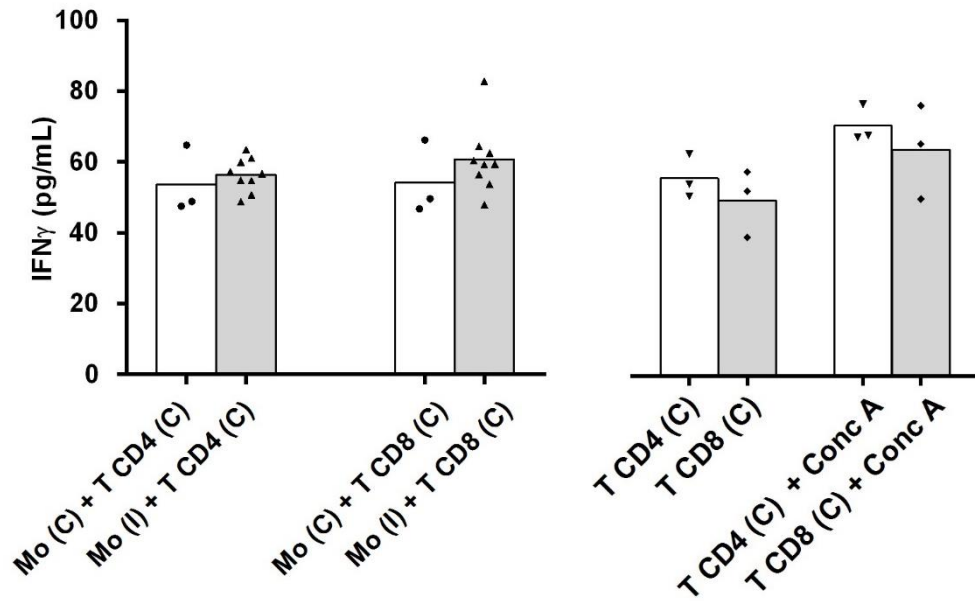
### c) Doseamento de IFN $\gamma$ e Óxido Nítrico nos sobrenadantes da co-cultura: macrófagos / linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>

Uma vez mais, tendo em conta o objetivo de se clarificar a relação entre os macrófagos e os linfócitos T no âmbito da DHC, dosearam-se os níveis de IFN $\gamma$  e óxido nítrico nos sobrenadantes da co-cultura de macrófagos com linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>, após 72 horas de co-cultura.

De acordo com os resultados (Figura 18), não há diferenças significativas nas concentrações de IFN $\gamma$  dos sobrenadantes da co-cultura de macrófagos isolados de coelhos infetados (I) com linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> (C) quando comparados com os sobrenadantes da co-cultura de macrófagos isolados de coelhos controlo (C) com os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> (C). Acresce o facto de ambas as populações de linfócitos analisadas, quando estimuladas com concanavalina A (controlo positivo) não terem apresentado um aumento significativo de IFN $\gamma$  como seria esperável.

Adicionalmente, os resultados mostraram ausência de óxido nítrico nos sobrenadantes da co-cultura, macrófagos isolados de coelhos infetados (I) com linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> de coelhos controlo (C) (dados não mostrados).





**Figura 18 - Doseamento de IFN $\gamma$  às 72 horas de co-cultura.** Estão representadas as concentrações de IFN $\gamma$  presentes nos sobrenadantes da co-cultura de macrófagos isolados de coelhos adultos controlo [Mo (C)] ou infetados [Mo (I)] com os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> isolados de coelhos adultos controlo [T CD4 (C) / T CD8 (C)] (n=3, 2 réplicas / animal), bem como dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> isolados de coelhos adultos controlo estimulados com concanavalina A [T CD4 / T CD8 (C) Conc A]; *Mann-Whitney test*.

## Discussão

A infeção com VDHC é responsável pela morte de cerca de 90% dos coelhos adultos infetados, no entanto, os coelhos jovens são naturalmente resistentes à infeção, desenvolvendo apenas uma doença subclínica [28, 62, 77].

Estudos prévios realizados no Departamento de Anatomia do ICBAS/UP sugerem que a resposta imunológica dos coelhos jovens à infeção pelo VDHC é substancialmente diferente da resposta desenvolvida pelos coelhos adultos que morrem espontaneamente com a DHC [28, 65, 67, 74, 78, 79]. Adicionalmente, estudos de outros grupos de investigadores, sugerem que nos macrófagos (população celular da imunidade inata) é possível detetar o VDHC [83], atribuindo aos macrófagos o papel da disseminação viral [63]. No entanto, a replicação do vírus nestas células é controversa, bem como permanecem ainda por explicar vários aspetos do papel destas células na fisiopatologia da infeção.

Está documentado que os macrófagos têm um papel chave no controlo precoce de infeções, nomeadamente contribuindo para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa a infeções virais [85]. No entanto, e paradoxalmente, é também sabido que em algumas febres hemorrágicas virais, como as induzidas pelos vírus Ébola e Marburgo, os aspetos centrais da fisiopatologia e do quadro clínico são causados pelos efeitos da replicação viral nos macrófagos e nas células dendríticas, sendo que os macrófagos poderão suprimir a resposta imune do hospedeiro contra o vírus, contribuindo para a sua disseminação sistémica, bem como poderão produzir vários mediadores inflamatórios que são responsáveis pelas lesões que acompanham esta doença, nomeadamente as vasculares [20, 94-96].

Deste modo, o principal objetivo deste trabalho foi contribuir para um melhor conhecimento do papel dos macrófagos na patogénese da DHC. Para isso, foi necessário comprovar a presença do vírus nesta população celular obtida a partir de animais infetados experimentalmente, desenvolver culturas de macrófagos alveolares e do fígado obtidas a partir de coelhos adultos infetados e controlo e subsequentemente avaliar os mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos de coelhos adultos infetados experimentalmente pelo VDHC.

Os resultados obtidos por imunofluorescência revelaram a presença do VDHC nos macrófagos às 24 horas após a infeção experimental com o vírus. Estes resultados são concordantes com estudos realizados no âmbito da DHC que demonstraram a presença do vírus em macrófagos, nomeadamente macrófagos alveolares e células de *Kupffer*, sugerindo serem células importantes na disseminação do VDHC, nomeadamente na

fase inicial da infeção, conduzindo o vírus até ao fígado, órgão onde acontece uma replicação viral intensa e rápida nos hepatócitos, e numa fase posterior levando o vírus do fígado até outros órgãos, onde se estabelecem lesões secundárias [63, 83].

Partindo assim de suspensões celulares de lavados broncoalveolares e do fígado de coelhos infetados e controlo foi possível estabelecer culturas celulares que se demonstrou serem constituídas por macrófagos. Note-se que em estudos prévios a estes ensaios, havíamos tentado infetar os macrófagos *in vitro*, o que não se revelou possível, obrigando a ensaios *ex vivo*, ou seja, à infeção experimental dos animais, seguida do isolamento dos macrófagos às 24 horas de infeção (a escolha do tempo destinou-se a assegurar uma taxa de infeção dos macrófagos superior aquela que se registaria em fases mais precoces de infeção, onde ainda não houve lugar a replicação ativa no órgão-alvo que é o fígado). É importante sublinhar mais uma vez que 24 horas de infeção não significa o mesmo nível de desenvolvimento da doença para todos os animais, dado que eles poderão morrer num intervalo entre as 24-48 horas. Assim, parte destes animais podem encontrar-se numa fase mais avançada da doença e outros numa fase inicial, o que constitui um dado relevante para a análise dos resultados.

Deste modo, às 2 horas de cultura, os macrófagos do fígado de coelhos adultos infetados com VDHC apresentaram uma expressão significativamente aumentada de *mRNA* tanto de citocinas próinflamatórias (*IL 1 $\beta$* , *TNF* e *IL6*) como de quimiocinas (*CCL2* e *CCL3*). O aumento significativo dos níveis de *mRNA* de citocinas próinflamatórias em homogeneizados de fígado de coelhos infetados com VDHC já havia sido documentada por outros autores que subsequentemente a este achado, sugeriram que esse aumento poderia facilitar o estabelecimento da infeção ou até desencadear uma resposta inflamatória exacerbada que contribuiria para o quadro histopatológico de hepatite fulminante observados nestes coelhos [80, 81]. Os nossos dados mostram que os macrófagos do fígado terão certamente um contributo importante para o aumento registado por esses autores nos níveis de *mRNA* de citocinas próinflamatórias no fígado *in totum* de coelhos adultos após 24 horas de infeção experimental [81]. Também conseguimos demonstrar que o aumento da expressão de *mRNA* de citocinas próinflamatórias se traduziu, em parte dos animais infetados, num aumento dos níveis de citocinas próinflamatórias (*IL1* e *TNF $\alpha$* ) e quimiocinas (*CCL2*) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos de fígado e às 2 horas de tempo de cultura. Todavia, como já evidenciado nos resultados, esse aumento só se revelou estatisticamente significativo para animais em fase mais avançada da evolução da doença. Efetivamente, considerando todos os animais utilizados neste estudo, não se detetaram diferenças significativas nos níveis de citocinas (*IL1*, *IL6*, *IFN $\alpha$*  e *IL10*)

presentes nos sobrenadantes da cultura de macrófagos às 2 horas de tempo de cultura. Estes resultados sugerem que apesar de as células estarem a expressar *mRNA* de citocinas pró-inflamatórias (*IL1 $\beta$* , *TNF* e *IL6*) e quimiocinas (*CCL2* e *CCL3*), estas não estarão a ser secretadas pelos macrófagos que foram isolados a partir de animais que se encontrem em fases iniciais da doença, ao contrário do que se demonstra para os macrófagos isolados dos animais em fases mais avançadas da DHC. De facto, dados não publicados pelo grupo do Departamento de Anatomia sugerem que o aumento da secreção destes mediadores inflamatórios parece estar associada às fases terminais da DHC, na medida em que nestas se observa um aumento abrupto de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente, *TNF $\alpha$* , *IL6*, *IL1*, *IL8* e *IFN $\alpha$*  no soro, poucas horas antes da morte dos animais por DHC. Este aumento substancial de citocinas pró-inflamatórias, conhecido por *cytokine storm*, está também documentado nas febres hemorrágicas induzidas pelo vírus Ébola e Marburgo [149, 150].

Para os tempos mais avançados das culturas celulares (6 e 26 horas) os resultados obtidos para os níveis de expressão de *mRNA* nos macrófagos dos fígados infetados não se revelaram tão consistentes quanto os determinados às 2 horas de cultura. A explicação para esta observação pode assentar num facto relativamente bem conhecido para este vírus – não cresce bem em culturas celulares - e que certamente tem contribuído para que a patogénese da DHC seja ainda tão pouco conhecida. Para reverter a putativa falta de estimulação induzida por um vírus que se replica com dificuldade em culturas celulares, procedeu-se à estimulação das células com VDHC ou VDHC+LPS, a fim de garantir que as células continuavam a ser estimuladas em cultura. Efetivamente os nossos resultados evidenciaram que, às 6 horas de cultura, o estímulo dos macrófagos do fígado com VDHC+LPS, permitiu incrementar os níveis de expressão relativa de todas as citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas analisadas (exceto *CCL2*) que nas culturas não estimuladas se encontravam significativamente aumentadas somente quanto aos níveis de expressão relativa de *mRNA* de *IL1 $\beta$* , *IL6* e *CCL2*. O mesmo estímulo não conseguiu, no entanto, reverter os resultados não significativos observados às 26 horas de infeção, o que pode estar relacionado com o facto de os macrófagos deixarem de ter capacidade de expressar o *mRNA* de citocinas e quimiocinas ou até mesmo começarem a entrar em apoptose.

Contrariamente ao documentado para os macrófagos do fígado isolados a partir dos coelhos infetados, para os mesmos tempos de cultura (2, 6 e 26 horas), não foram encontradas diferenças significativas na expressão de *mRNA* dos vários mediadores inflamatórios analisados nas culturas de macrófagos alveolares dos coelhos infetados, comparativamente às culturas dos coelhos controlo. No entanto, e à semelhança do que se verificou para os macrófagos do fígado, quando os valores são analisados

individualmente, e correlacionados com o nível de lesão hepática, também se registou para as 2 horas do tempo de cultura e nos animais que estavam numa fase mais avançada da DHC, uma expressão de *mRNA* de citocinas proinflamatórias e quimiocinas superior aos que estavam num estado mais precoce da doença. Interessantemente observou-se, para o tempo 6 horas de cultura, que para os macrófagos broncoalveolares estimulados com VDHC se obtiveram níveis de expressão relativa de *mRNA* de *IL1 $\beta$*  e *CCL2* significativamente inferiores nos coelhos infetados quando comparado com os controlos. Apesar de não se detetarem mais diferenças significativas para este estímulo, bem como para o tempo 26 horas de cultura, regista-se uma tendência para os níveis de expressão relativa de *mRNA* dos vários mediadores inflamatórios dos macrófagos alveolares dos coelhos infetados serem inferiores comparativamente com os controlos. Estes resultados podem sugerir que o VDHC consegue, de algum modo, suprimir a expressão de *mRNA* de alguns mediadores inflamatórios nos macrófagos alveolares, numa fase inicial da infeção, sendo que o aumento apenas acontecerá para as fases terminais da doença. De facto, resultados semelhantes já foram reportados na febre hemorrágica viral induzida pelos vírus Ébola, na qual está documentada que apesar de se observar, imediatamente após a exposição ao vírus Ébola, um aumento transitório nos níveis de *mRNA* de citocinas e de quimiocinas, 2 horas após exposição ao vírus, os níveis de *mRNA* de citocinas e quimiocinas são bastante reduzidos, sendo que níveis elevados, causadores de lesão só se verificam para fases mais avançadas da doença [151]. Fica, no entanto, por confirmar esta hipótese que necessita da realização de mais estudos, nomeadamente, o aumento do número de animais.

Trabalhos de Sanchez-Campos e colegas [80] demonstraram um aumento dos níveis de expressão do *mRNA* de *TGF $\beta$ 1*, uma citocina anti-inflamatória, no fígado de coelhos adultos após 24 horas de infeção experimental. Também resultados do grupo de investigação do departamento de Anatomia do ICBAS/UP e UMIB evidenciaram um aumento no soro dos níveis de citocinas anti-inflamatórias (*TGF $\beta$*  e *IL10*) em coelhos adultos e às 24 horas de infeção pelo VDHC, apesar de este aumento não estar positivamente correlacionado com o número de células T reguladoras presentes no baço dos mesmos animais [82]. De facto, apesar destas células puderem contribuir para a produção das referidas citocinas, outras populações celulares poderão ter um contributo importante. Neste trabalho indagou-se se os macrófagos do fígado e alveolares isolados a partir de coelhos adultos infetados poderiam ter um contributo para o aumento de citocinas anti-inflamatórias registado no curso da DHC. Para tal, foram avaliados os níveis de expressão do *mRNA* de *IL10* em culturas de macrófagos do fígado e alveolares de coelhos adultos infetados, assim como os níveis de *IL10* presente nos sobrenadantes

das mesmas culturas celulares. Os nossos resultados não evidenciaram diferenças significativas, quer ao nível da expressão de *mRNA* de IL10, quer da quantidade da mesma citocina, presente em culturas de macrófagos de fígado e alveolares isolados de coelhos adultos infetados quando comparados com coelhos controlo. No entanto, para os animais que se encontravam numa fase mais avançada da doença, registou-se um aumento significativo do *mRNA* desta citocina nos macrófagos alveolares dos coelhos infetados comparativamente com os controlos. Estes dados sugerem assim que na fase terminal da doença estas populações possam contribuir para o aumento registado por Sanchez-Campos e colegas [80] dos níveis de *mRNA* de citocinas anti-inflamatórias presentes no fígado de coelhos infetados pelo VDHC e para o incremento dos níveis séricos de TGF $\beta$  e IL10 em coelhos adultos infetados, tal como documentado pelo grupo do Departamento de Anatomia do ICBAS/UP e UMIB.

Numa segunda fase do trabalho, pretendeu-se contribuir para a clarificação da relação entre os macrófagos e os linfócitos T, nomeadamente CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no âmbito da DHC. Assim, decidimos avaliar a capacidade de os macrófagos ativarem linfócitos T, *in vitro*, bem como a capacidade que estas células têm em estimular a atividade microbicida dos macrófagos. Estes podem ser ativados pela combinação dos estímulos inatos (estimulação dos TLR com agonistas, como por exemplo, o LPS, que induz a produção de TNF) com a ação do IFN $\gamma$ , sendo que esta ativação resulta numa população de macrófagos com uma capacidade microbicida aumentada, com expressão de altos níveis de citocinas proinflamatórias (TNF $\alpha$ , IL1 e IL6) e elevada produção de espécies reativas de oxigénio e azoto [101, 106, 107]. Consequentemente, uma resposta adaptativa é geralmente necessária para a manutenção da ativação dos macrófagos e a defesa contra os patógenos, que é tipicamente provida pela produção sustentada de IFN $\gamma$  pelos linfócitos T [102].

Os nossos resultados não demonstraram diferenças significativas nos níveis de *mRNA* dos vários mediadores inflamatórios analisados (*TNF*, *IL1 $\beta$* , *IL6*, *CCL2*, *CCL3* e *IL10*) expressos pelas células em co-cultura, ou seja, macrófagos isolados de coelhos infetados com os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> quando comparados com os macrófagos isolados de coelhos controlo em co-cultura com os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>. Adicionalmente, não se detetaram diferenças significativas nas concentrações de IFN $\gamma$  dos sobrenadantes da co-cultura de macrófagos isolados de coelhos infetados com os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> quando comparados com os sobrenadantes da co-cultura de macrófagos isolados de coelhos controlo com os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>. Por outro lado, também não foi possível mostrar se os linfócitos T eram capazes de induzir a atividade microbicida dos macrófagos, já que não se detetou a presença de óxido

nítrico nos sobrenadantes das culturas. Estes dados sugerem que os macrófagos podem não ter a capacidade de ativar os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>, *in vitro*, muito embora estes resultados não sejam admitidos como definitivos, uma vez que este foi apenas um ensaio preliminar, sendo necessário apurar alguns parâmetros para que o ensaio seja considerado robusto. Analisando com mais detalhe os resultados, verificou-se que os macrófagos parecem estar viáveis, uma vez que, quando estimulados com LPS (controlo positivo) apresentam níveis de expressão de *mRNA* dos mediadores inflamatórios superiores quando comparados com os que não foram estimulados. No entanto, verificou-se também que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> mesmo quando estimulados com Concanavalina A (controlo positivo) não apresentam níveis superiores de IFN $\gamma$  comparativamente aos controlos, o que sugere que estas células poderiam não estar viáveis, justificando os resultados obtidos nestes ensaios de co-cultura.

## Conclusão

Este trabalho teve como objetivos contribuir para um melhor conhecimento do papel dos macrófagos na patogénese da DHC, caracterizando os mediadores inflamatórios produzidos em cultura pelos macrófagos de coelhos adultos infetados experimentalmente pelo VDHC, bem como esclarecer, *in vitro*, putativas influências biunívocas entre estas células da imunidade inata, os macrófagos, e células da imunidade adquirida, os linfócitos T, nomeadamente CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, no contexto da infeção pelo VDHC.

Os resultados obtidos confirmaram a presença do VDHC nos macrófagos alveolares e do fígado isolados de coelhos adultos após 24 horas de infeção experimental com VDHC. As culturas celulares de macrófagos alveolares e do fígado que conseguimos estabelecer permitiram-nos documentar que às 2 horas do tempo de cultura os macrófagos do fígado de coelhos adultos infetados com VDHC apresentam uma expressão significativamente superior de *mRNA* tanto de citocinas proinflamatórias, como de quimiocinas. Nos animais em estado mais avançado da DHC, confirmada pelo grau de infeção dos hepatócitos e lesão celular, este aumento de expressão de *mRNA* dos mediadores proinflamatórios traduziu-se, para o mesmo tempo de cultura, em níveis significativamente mais elevados das citocinas proinflamatórias IL1 e TNF $\alpha$ , bem como, da quimiocina CCL2, presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos de fígado isolados de coelhos infetados quando comparados com os dos coelhos controlo. Estes resultados sugerem que os macrófagos do fígado terão certamente um contributo importante para o incremento dos níveis de expressão de *mRNA* de citocinas proinflamatórias, documentado no fígado *in totum* por outros autores, bem como para o fenómeno de *cytokine storm* que se observa na fase final da DHC a que em outras febres hemorrágicas virais, como as induzidas pelo vírus Ébola e Marburgo, tem sido atribuída a responsabilidade de provocar lesão tecidual alastrada a vários órgãos, onde se inclui o fígado. Nas mesmas febres hemorrágicas virais estão documentadas alterações funcionais nos macrófagos alveolares, que alternam entre depressão na produção de citocinas, nas fases iniciais da infeção, com incrementos substanciais das mesmas moléculas, nas fases terminais da doença. Os resultados obtidos no doseamento dos níveis de expressão de *mRNA* de citocinas proinflamatórias e quimiocinas em culturas de macrófagos alveolares isoladas de animais infetados, e estimuladas com VDHC às 6 horas de infeção, quando comparados com os resultados de culturas de macrófagos isolados de coelhos controlo, mesmo que estatisticamente



não significativos, sugerem que tal mecanismo fisiopatológico possa estar presente na DHC, merecendo ser futuramente indagado.

Para o segundo propósito deste trabalho, os resultados foram considerados inconclusivos, no que respeita à capacidade de os macrófagos ativarem linfócitos T, *in vitro*, bem como à capacidade de os linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) produzirem citocinas que estimulam a atividade microbida dos macrófagos.

## Perspetivas Futuras

Como documentado por este trabalho, para os mesmos tempos de infeção experimental, a DHC pode apresentar-se em fases de evolução bem diferenciadas entre os animais (desde fase inicial até estado terminal), sendo que estas se poderão traduzir em diferentes mecanismos fisiopatológicos, nos quais a participação dos macrófagos assumirá certamente um papel importante. Assim, será importante, para dar significância a alguns dados deste trabalho, nomeadamente ao papel distinto que os macrófagos alveolares podem assumir em diferentes fases da evolução da doença, aumentar o número de animais sacrificados às 24 horas de infeção. A repetição destes ensaios *in vitro* aplicados a culturas primárias de macrófagos isolados de coelhos jovens infetados por VDHC, é também um desafio futuro, pois ao permitir comparar resultados entre coelhos adultos e jovens infetados, contribuirá certamente para melhorar o conhecimento sobre a patogénese da DHC, onde estão implícitos os mecanismos de resistência a esta infeção viral que são exibidos pelos animais jovens.

Não tendo sido possível obter resultados conclusivos no que respeita à capacidade de os macrófagos ativarem linfócitos T, *in vitro*, bem como à capacidade de os linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) produzirem citocinas que estimulam a atividade microbida dos macrófagos, é também objetivo da prossecução destes trabalhos repetir este ensaio.

## Referências Bibliográficas

1. Pringle, C.R., *The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV Report in 1995*. Arch Virol, 1998. **143**: p. 203-210.
2. Chasey, D., *Rabbit haemorrhagic disease: the new scourge of *Oryctolagus cuniculus**. Lab Anim, 1997. **31**(1): p. 33-44.
3. Liu, S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., Quian, N.H., *A new disease in rabbits*. Anim Husb Vet Med, 1984. **16**: p. 253-255.
4. Xu, W.Y., *Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation*. Rev Sci Tech, 1991. **10**(2): p. 393-408.
5. Cancellotti, F.M. and M. Renzi, *Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy*. Rev Sci Tech, 1991. **10**(2): p. 409-22.
6. Delibes-Mateos, M., et al., *Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot*. Conserv Biol, 2008. **22**(5): p. 1106-17.
7. Argüello, J.L., Llanos, A., Pérez, L., *Enfermedad hemorrágica del conejo en España*. Med Vet, 1988. **5**: p. 645-650.
8. Anonymous, *Doença hemorrágica a vírus do Coelho em Portugal*. Rev Port Ciênc Vet, 1989. **84**: p. 57-58.
9. Villafuerte, R., Calvete, C., Blanco, J.C., Lucientes, J., *Incidence of viral hemorrhagic disease in wild rabbit populations in Spain*. Mammalia, 1995. **59**: p. 651-659.
10. Morisse, J.P., G. Le Gall, and E. Boilletot, *Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses*. Rev Sci Tech, 1991. **10**(2): p. 269-310.
11. Gregg, D.A., et al., *Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization*. Rev Sci Tech, 1991. **10**(2): p. 435-51.
12. *Rabbit calicivirus infection confirmed in Iowa rabbitry*. J Am Vet Med Assoc, 2000. **216**(10): p. 1537.
13. Fenner, F., *Deliberate introduction of the European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, into Australia*. Rev Sci Tech, 2010. **29**(1): p. 103-11.
14. Cooke, B.D., *Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations*. Rev Sci Tech, 2002. **21**(2): p. 347-58.
15. Cooke, B.D. and F. Fenner, *Rabbit haemorrhagic disease and the biological control of wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in Australia and New Zealand*. Wildlife Research, 2002. **29**(6): p. 689-706.
16. Mutze, G., B. Cooke, and P. Alexander, *The initial impact of rabbit hemorrhagic disease on European rabbit populations in South Australia*. J Wildl Dis, 1998. **34**(2): p. 221-7.
17. O'Keefe, J.S., et al., *Typing of rabbit haemorrhagic disease virus from New Zealand wild rabbits*. N Z Vet J, 1998. **46**(1): p. 42-3.
18. McIntosh, M.T., et al., *A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas*. Virol J, 2007. **4**: p. 96.
19. Abrantes, J., et al., *Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review*. Vet Res, 2012. **43**: p. 12.
20. Mahanty, S. and M. Bray, *Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers*. Lancet Infect Dis, 2004. **4**(8): p. 487-98.
21. Ohlinger, V.F., et al., *Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease*. J Virol, 1990. **64**(7): p. 3331-6.

22. Parra, F. and M. Prieto, *Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits*. J Virol, 1990. **64**(8): p. 4013-5.
23. Meyers, G., C. Wirblich, and H.J. Thiel, *Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome*. Virology, 1991. **184**(2): p. 664-76.
24. An, S.-H., Kim, B.-H., Lee, J.B., Song, J.U., Park, B.K., Kwon, Y.B., Jung, J.S., Lee, Y.S., *Studies on Picornavirus hemorrhagic fever (tentative name) in rabbit. 1. Physico-chemical properties of the casuative virus*. Res Rep Rural Dev Adm, 1988. **30**: p. 55-61.
25. Gregg, D.A. and C. House, *Necrotic hepatitis of rabbits in Mexico: a parvovirus*. Vet Rec, 1989. **125**(24): p. 603-4.
26. Green, K.Y., et al., *Taxonomy of the Caliciviruses*. Journal of Infectious Diseases, 2000. **181**(Supplement 2): p. S322-S330.
27. Valicek, L., et al., *Electron and immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)*. Arch Virol, 1990. **112**(3-4): p. 271-5.
28. Ferreira, P.G., et al., *Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease*. Res Vet Sci, 2004. **76**(1): p. 83-94.
29. Meyers, G., et al., *Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs*. Virology, 2000. **276**(2): p. 349-63.
30. Miller, W.A. and G. Koev, *Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses*. Virology, 2000. **273**(1): p. 1-8.
31. Wirblich, C., H.J. Thiel, and G. Meyers, *Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7974-83.
32. Esteves, P.J., et al., *Detection of positive selection in the major capsid protein VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)*. Virus Research, 2008. **137**(2): p. 253-256.
33. Liu, G., et al., *A DNA-launched reverse genetics system for rabbit hemorrhagic disease virus reveals that the VP2 protein is not essential for virus infectivity*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 12): p. 3080-5.
34. Chen, L., et al., *Minor structural protein VP2 in rabbit hemorrhagic disease virus downregulates the expression of the viral capsid protein VP60*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 12): p. 2952-5.
35. Le Gall, G., et al., *Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 1): p. 11-6.
36. Le Gall-Recule, G., et al., *Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants*. Arch Virol, 2003. **148**(1): p. 65-81.
37. Capucci, L., et al., *A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant*. Virus Res, 1998. **58**(1-2): p. 115-26.
38. Muller, A., et al., *Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (Oryctolagus cuniculus) from the Iberian Peninsula*. Vet Microbiol, 2009. **135**(3-4): p. 368-73.
39. Alda, F., et al., *Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe*. BMC Evol Biol, 2010. **10**: p. 347.
40. Milton, I.D., et al., *Genomic 3' terminal sequence comparison of three isolates of rabbit haemorrhagic disease virus*. FEMS Microbiol Lett, 1992. **72**(1): p. 37-42.
41. Capucci, L., et al., *Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8614-23.

42. Forrester, N.L., R.C. Trout, and E.A. Gould, *Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire*. *Virology*, 2007. **358**(1): p. 18-22.
43. Forrester, N.L., et al., *Co-circulation of widely disparate strains of rabbit haemorrhagic disease virus could explain localised epidemicity in the United Kingdom*. *Virology*, 2009. **393**(1): p. 42-8.
44. Moss, S.R., et al., *Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus*. *J Gen Virol*, 2002. **83**(Pt 10): p. 2461-7.
45. Strive, T., et al., *The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus*. *Virology*, 2010. **398**(1): p. 125-34.
46. Le Gall-Recule, G., et al., *Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV*. *Virology*, 2011 **410**(2): p. 395-402.
47. Marchandeau, S., et al., *Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus*. *Vet Res*, 2005. **36**(1): p. 53-62.
48. Xu, Z.J. and W.X. Chen, *Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review*. *Vet Res Commun*, 1989. **13**(3): p. 205-12.
49. Asgari, S., et al., *Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by flies (Diptera:Calliphoridae) among wild rabbits in Australia*. *Virus Res*, 1998. **54**(2): p. 123-32.
50. Ohlinger, V.F., B. Haas, and H.J. Thiel, *Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus*. *Vet Res*, 1993. **24**(2): p. 103-16.
51. Chasey, D., *Possible origin of rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom*. *Vet Rec*, 1994. **135**(21): p. 496-9.
52. Frolich, K., F. Klima, and J. Dedek, *Antibodies against rabbit hemorrhagic disease virus in free-ranging red foxes from Germany*. *J Wildl Dis*, 1998. **34**(3): p. 436-42.
53. Smith, A.W., et al., *Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements*. *Emerg Infect Dis*, 1998. **4**(1): p. 13-20.
54. Arguello Villares, J.L., *Viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and immune response*. *Rev Sci Tech*, 1991. **10**(2): p. 459-80.
55. Henning, J., et al., *Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment*. *Epidemiol Infect*, 2005. **133**(4): p. 719-30.
56. Mitro, S. and H. Krauss, *Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology*. *Eur J Epidemiol*, 1993. **9**(1): p. 70-8.
57. Marcato, P.S., et al., *Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome*. *Rev Sci Tech*, 1991. **10**(2): p. 371-92.
58. Fuchs, A. and H. Weissenböck, *Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS)*. *J Comp Pathol*, 1992. **107**(1): p. 103-13.
59. NM, P., *Viral hemorrhagic disease. A major new disease problem of rabbits*. *Rabbit Res.*, 1989. **12**: p. 64-67.
60. Alexandrov, M., et al., *Immunohistochemical localization of the rabbit haemorrhagic disease viral antigen*. *Arch Virol*, 1992. **127**(1-4): p. 355-63.
61. Park, J.H. and C. Itakura, *Detection of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in tissues by immunohistochemistry*. *Res Vet Sci*, 1992. **52**(3): p. 299-306.
62. Prieto, J.M., et al., *Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits*. *Res Vet Sci*, 2000. **68**(2): p. 181-7.
63. Kimura, T., et al., *Distribution of rabbit haemorrhagic disease virus RNA in experimentally infected rabbits*. *J Comp Pathol*, 2001. **124**(2-3): p. 134-41.
64. Ueda, K., et al., *Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease*. *Jpn J Vet Res*, 1992. **40**(4): p. 133-41.

65. Ferreira, P.G., et al., *Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection*. Res Vet Sci, 2006. **80**(2): p. 218-25.
66. Ferreira, P.G., et al., *Liver enzymes and ultrastructure in rabbit haemorrhagic disease (RHD)*. Vet Res Commun, 2006. **30**(4): p. 393-401.
67. Ferreira, P.G., et al., *Leukocyte-hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD)*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **103**(3-4): p. 217-21.
68. Huang, H.B., *Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the People's Republic of China*. Rev Sci Tech, 1991. **10**(2): p. 481-98.
69. Smid, B., et al., *Rabbit haemorrhagic disease: an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine*. Vet Microbiol, 1991. **26**(1-2): p. 77-85.
70. Calvete, C., et al., *Effects of vaccination against viral haemorrhagic disease and myxomatosis on long-term mortality rates of European wild rabbits*. Vet Rec, 2004. **155**(13): p. 388-92.
71. OT., M., *Rabbit haemorrhagic disease*. Office International des Epizooties., 2010: p. 1-15.
72. Ferreira, P.G., A. Costa-e-Silva, and A.P. Aguas, *Liver disease in young rabbits infected by calicivirus through nasal and oral routes*. Res Vet Sci, 2006. **81**(3): p. 362-5.
73. Ferreira, P.G., et al., *Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits*. Vet Immunol Immunopathol, 2008. **121**(3-4): p. 364-9.
74. Marques, R.M., et al., *Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection*. Vet Immunol Immunopathol, 2012. **150**(3-4): p. 181-8.
75. Ruvoen-Clouet, N., et al., *Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family*. J Virol, 2000. **74**(24): p. 11950-4.
76. Nystrom, K., et al., *Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner*. PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002188.
77. Mikami, O., et al., *Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus*. Res Vet Sci, 1999. **66**(3): p. 237-42.
78. Marques, R.M., et al., *Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD)*. Vet Res, 2014. **45**: p. 14.
79. Marques, R.M., et al., *Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits*. Vet Res Commun, 2010. **34**(8): p. 659-68.
80. Sanchez-Campos, S., et al., *Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: rabbit hemorrhagic viral disease*. J Lab Clin Med, 2004. **144**(4): p. 215-22.
81. García-Lastra, R. and B. San-Miguel, *Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure*. 2010. **41**(1).
82. Teixeira, L., et al., *Regulatory T cells are decreased in acute RHDV lethal infection of adult rabbits*. Vet Immunol Immunopathol, 2012. **148**(3-4): p. 343-7.
83. Ramiro-Ibanez, F., et al., *Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology*. Virus Res, 1999. **60**(1): p. 21-8.
84. Teifke, J.P., I. Reimann, and H. Schirrmeier, *Subacute liver necrosis after experimental infection with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)*. J Comp Pathol, 2002. **126**(2-3): p. 231-4.
85. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 65-91.

86. Melchjorsen, J., L.N. Sorensen, and S.R. Paludan, *Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(3): p. 331-43.
87. Kodukula, P., et al., *Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2895-905.
88. Gosselin, J., et al., *Modulatory effects of Epstein-Barr, herpes simplex, and human herpes-6 viral infections and coinfections on cytokine synthesis. A comparative study*. J Immunol, 1992. **149**(1): p. 181-7.
89. Croen, K.D., *Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2446-52.
90. Karupiah, G., et al., *Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase*. Science, 1993. **261**(5127): p. 1445-8.
91. Paludan, S.R., *Interactions between herpes simplex virus and leukocytes: molecular mechanisms and impact on antiviral defense*. 2003: Det sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet.
92. Lang, P.A., et al., *Tissue macrophages suppress viral replication and prevent severe immunopathology in an interferon-I-dependent manner in mice*. Hepatology, 2010. **52**(1): p. 25-32.
93. Fink, K., et al., *Depletion of macrophages in mice results in higher dengue virus titers and highlights the role of macrophages for virus control*. Eur J Immunol, 2009. **39**(10): p. 2809-21.
94. Bray, M., *Pathogenesis of viral hemorrhagic fever*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(4): p. 399-403.
95. Bray, M. and T.W. Geisbert, *Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(8): p. 1560-6.
96. Mehedi, M., et al., *Clinical aspects of Marburg hemorrhagic fever*. Future Virol, 2011. **6**(9): p. 1091-1106.
97. Labonte, A.C., A.C. Tosello-Trampont, and Y.S. Hahn, *The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases*. Mol Cells, 2014. **37**(4): p. 275-85.
98. Duffield, J.S., et al., *Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 56-65.
99. Mantovani, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. J Pathol, 2013. **229**(2): p. 176-85.
100. Heydtmann, M., *Macrophages in hepatitis B and hepatitis C virus infections*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 2796-802.
101. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
102. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
103. Richard A. Goldsby, T.J.K., Barbara A. Osborne, Janis Kuby, *Immunology*. Fifth Edition ed. 2002: W. H. Freeman.
104. Gordon, S., *The macrophage: past, present and future*. Eur J Immunol, 2007. **37** Suppl 1: p. S9-17.
105. Bowdish, D.M.E., Gordon, S., *Macrophage Biology*, in *Protozoans in Macrophages*, E.Y.D.R. Gazzinelli., Editor. 2007, Landes Biosciences.
106. O'Shea, J.J. and P.J. Murray, *Cytokine signaling modules in inflammatory responses*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 477-87.
107. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
108. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.

109. Modolell, M., et al., *Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines*. Eur J Immunol, 1995. **25**(4): p. 1101-4.
110. Verschoor, C.P., A. Puchta, and D.M. Bowdish, *The macrophage*. Methods Mol Biol, 2012. **844**: p. 139-56.
111. Gwinn, M.R. and V. Vallyathan, *Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2006. **9**(1): p. 27-39.
112. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-16.
113. Jensen, P.E., *Recent advances in antigen processing and presentation*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1041-1048.
114. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
115. Clark, I.A., *How TNF was recognized as a key mechanism of disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(3-4): p. 335-43.
116. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor, other cytokines and disease*. Annu Rev Cell Biol, 1993. **9**: p. 317-43.
117. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
118. Chang, H.Y. and X. Yang, *Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 821-46.
119. Barnes, P.J. and M. Karin, *Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. N Engl J Med, 1997. **336**(15): p. 1066-71.
120. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
121. Shaikh, P.Z., *Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review*. Int. J. of Pharm. & Life Sci., 2011. **2**(11): p. 1247-1263.
122. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 787-820.
123. Borish, L.C. and J.W. Steinke, 2. *Cytokines and chemokines*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2 Suppl): p. S460-75.
124. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
125. Daly, C. and B.J. Rollins, *Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies*. Microcirculation, 2003. **10**(3-4): p. 247-57.
126. Menten, P., A. Wuyts, and J. Van Damme, *Macrophage inflammatory protein-1*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(6): p. 455-81.
127. Maurer, M. and E. von Stebut, *Macrophage inflammatory protein-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1882-6.
128. Trapnell, B.C. and J.A. Whitsett, *Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 775-802.
129. Schneider, C., et al., *Alveolar macrophages are essential for protection from respiratory failure and associated morbidity following influenza virus infection*. PLoS Pathog, 2014. **10**(4): p. e1004053.
130. Yamashita CM, V.R., Gill SE, *Alveolar macrophages and pulmonary surfactant-more than just friendly neighbours*. OA Biology, 2013(1): p. 1-6.
131. Balhara, J. and A.S. Gounni, *The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(6): p. 605-609.
132. Hussell, T. and T.J. Bell, *Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(2): p. 81-93.
133. Lohmann-Matthes, M.L., C. Steinmuller, and G. Franke-Ullmann, *Pulmonary macrophages*. Eur Respir J, 1994. **7**(9): p. 1678-89.



134. Steinmuller, C., et al., *Local activation of nonspecific defense against a respiratory model infection by application of interferon-gamma: comparison between rat alveolar and interstitial lung macrophages*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(4): p. 481-90.
135. Bilzer, M., F. Roggel, and A.L. Gerbes, *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. Liver Int, 2006. **26**(10): p. 1175-86.
136. Crispe, I.N., *The Liver as a Lymphoid Organ*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**(1): p. 147-163.
137. Parker, G.A. and C.A. Picut, *Liver Immunobiology*. Toxicologic Pathology, 2005. **33**(1): p. 52-62.
138. Jenne, C.N. and P. Kubes, *Immune surveillance by the liver*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 996-1006.
139. Vollmar, B. and M.D. Menger, *The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair*. Vol. 89. 2009. 1269-1339.
140. Boltjes, A., et al., *The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections*. J Hepatol, 2014. **61**(3): p. 660-71.
141. You, Q., et al., *Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells*. Hepatology, 2008. **48**(3): p. 978-90.
142. Sheth, K. and P. Bankey, *The liver as an immune organ*. Curr Opin Crit Care, 2001. **7**(2): p. 99-104.
143. Teixeira, L., et al., *A simple and rapid method for isolation of caliciviruses from liver of infected rabbits*. Res Vet Sci, 2011. **91**(1): p. 164-6.
144. Genini, S., et al., *Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 10): p. 2550-64.
145. Li, W., et al., *Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to porcine circovirus type 2*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 353.
146. Godornes, C., et al., *Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR*. Cytokine, 2007. **38**(1): p. 1-7.
147. Ishii, T., et al., *Stability of housekeeping genes in alveolar macrophages from COPD patients*. Eur Respir J, 2006. **27**(2): p. 300-6.
148. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method*. Nat. Protocols, 2008. **3**(6): p. 1101-1108.
149. Baize, S., et al., *Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients*. Clin Exp Immunol, 2002. **128**(1): p. 163-8.
150. Paessler, S. and D.H. Walker, *Pathogenesis of the viral hemorrhagic fevers*. Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 411-40.
151. Gibb, T.R., et al., *Viral replication and host gene expression in alveolar macrophages infected with Ebola virus (Zaire strain)*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(1): p. 19-27.